



**Universidade Nova de Lisboa**

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Bioensaio de extratos vegetais em *Biomphalaria glabrata* exposta a *Schistosoma mansoni***

**HÉLDER FELÍCIO FERNANDES**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
PARASITOLOGIA MÉDICA**

**outubro, 2014**



**Universidade Nova de Lisboa**

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Bioensaio de extratos vegetais em *Biomphalaria glabrata* exposta a *Schistosoma mansoni***

**Autor :** Hélder Felício Fernandes

**Orientadora :** Professora Doutora Maria Manuela Calado

**Co-orientador :** Investigador Auxiliar Fernando Cardoso

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica



“Words build bridges into unexplored regions.”

(anónimo)

## **Agradecimentos**

A Deus que me permitiu realizar esta tese e ajudou-me nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Professora Doutora Manuela Calado por toda a ajuda, disponibilidade e simpatia, pela paciência, pelo apoio incondicional, empenho e pelos conselhos durante todo o trabalho.

Ao meu co-orientador, Investigador Auxiliar Fernando Cardoso, por toda a simpatia e disponibilidade, pelos conhecimentos partilhados, pela motivação e pela imprescindível ajuda para a realização deste trabalho.

Ao Doutor Luís Catarino (JBT – IICT/CIBIO) e Professor Bucar Indjai (INEP – Guiné-Bissau), pelas plantas gentilmente cedidas, sem as quais seria impossível a realização deste trabalho.

Aos professores, mestres e auxiliares da Unidade de Helminologia e Malacologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa, pela partilha de conhecimento e ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao Tiago Mendes, meu colega por todo o tempo dispensado, pela imediata disponibilidade e constante boa disposição, por todo o esforço e dedicação e por todos os conselhos e auxílio nas diversas etapas deste trabalho.

A todos os meus restantes colegas do Mestrado em Parasitologia Médica pelo companheirismo e bons momentos passados durante este dois anos.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais e namorada pela força e o apoio incondicional que sempre me transmitiram mesmo nos momentos mais difíceis.

## Resumo

A schistosomose causada por *Schistosoma mansoni* é uma das parasitoses mais prevalentes em humanos, sendo o seu hospedeiro intermediário um molusco de água doce da espécie *Biomphalaria glabrata*. Para o controlo desta parasitose, além do tratamento dos doentes infetados, também é importante que as populações de moluscos sejam controladas.

Visando encontrar estratégias de controlo dos moluscos, este estudo pretende clarificar o papel de alguns extratos vegetais enquanto inibidores do desenvolvimento do parasita na fase intra molusco. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a atividade biológica de extratos de folhas de duas plantas da Guiné-Bissau (*Abrus precatorius* e *Khaya senegalensis*) sobre *Biomphalaria glabrata* infetada com *Schistosoma mansoni*. Os parâmetros avaliados foram a sobrevivência/mortalidade, oviposição, eliminação de cercárias e a sua viabilidade no hospedeiro definitivo (murganho), assim como a presença de danos no DNA dos moluscos através da técnica de *Comet Assay*.

Embora os obtidos resultados sejam bastante preliminares, parecem indicar que os extratos de folhas de *Abrus precatorius* e *Khaya senegalensis* não apresentam atividade moluscicida uma vez que ocorreu uma baixa taxa mortalidade nos grupos de moluscos expostos aos extratos e esta ocorreu ao longo do bioensaio e não nas primeiras 24 horas de exposição. Através da técnica de *Comet assay* foi possível verificar que o DNA dos moluscos expostos aos extratos apresentava danos, mas não significativos. Em relação ao grupo de moluscos infetados com *S.mansoni* e expostos aos extratos, só os que foram expostos ao extrato de *A. precatorius* e a DMSO apresentaram danos significativos no DNA.

No que diz respeito à libertação de cercárias demonstrou que a exposição aos extratos induziu uma maior libertação de cercárias por parte dos moluscos quando comparativamente ao grupo de moluscos só infetados com *S.mansoni*, no entanto estas diferenças não se apresentam como significativas.

Em relação à oviposição, os extratos em si parecem não ser responsáveis pelo aumento do número médio de posturas produzidas por *B.glabrata*. Embora tenham existido diferenças no número médio de posturas produzidas entre os vários grupos experimentais, estas só foram significativas no grupo de moluscos infetados e expostos ao extrato de *K.senegalensis* e no grupo de moluscos infetados mas não expostos a nenhum extrato (neste caso no controlo para os moluscos expostos ao extrato de *K. senegalensis*). Por outro lado, os extratos parecem afetar a viabilidade das formas infetantes, quer para o hospedeiro definitivo (cercárias), quer para o hospedeiro intermediário (miracídeos).

**Palavras-chave:** *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, *Khaya senegalensis*, *Abrus precatorius*.

## Abstract

Schistosomiasis, caused by *Schistosoma mansoni*, is one of the most prevalent parasitic diseases in humans, its intermediate host is a freshwater mollusc from the species *Biomphalaria glabrata*. For the control of this disease, besides treatment of infected patients, it is also important that the mollusc populations are controlled.

In order to find strategies for control of molluscs, this study aimed to investigate the activity of plant extracts as inhibitors of parasite development in mollusc. The main objective was to evaluate the biological activity of extracts from the leaves of two plants from Guinea-Bissau (*Abrus precatorius* and *Khaya senegalensis*) in *Biomphalaria glabrata* exposed to *Schistosoma mansoni*. The parameters evaluated were survival / mortality, oviposition, elimination of cercariae and its viability on the definitive host (mouse) as well as DNA damage in the molluscs through the technique of *Comet Assay*.

Although the results are very preliminary, they seem to indicate that the extracts from leaves of *Abrus precatorius* and *Khaya senegalensis* don't have molluscicidal activity, as the mortality rate was low in the groups of molluscs exposed to the extracts and mortality occurred later in the bioassay and not during the first 24 hours post-exposure. Through the technique of *Comet assay* we found that the DNA from molluscs exposed to extracts showed damage but that it was not significant. Regarding the group of molluscs infected with *S.mansoni* and exposed to the extracts, only those exposed to the extract of *A. precatorius* and DMSO showed significant DNA damage.

Exposure to extracts induced an increase in the release of cercariae by the molluscs when compared to the group of molluscs infected only with *S.mansoni*, however these differences were not statistically significant.

It was not detected an increase in the average number of eggs produced by *B.glabrata* exposed to the extracts. Although there were differences in the mean number of eggs produced between the various experimental groups, they were only significant between the group of molluscs infected and exposed to the extract from *Khaya senegalensis* and in the group infected but not exposed to any of the extracts (specifically in the control for the molluscs exposed to the extract of *Khaya senegalensis*). On the other hand the extracts appear to affect the viability of the infective forms in the definitive host (cercariae), and in the intermediate host (miracidia).

**Keywords:** *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, *Khaya senegalensis*, *Abrus precatorius*.

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	I
<b>Resumo</b> .....	II
<b>Abstract</b> .....	III
<b>Índice</b> .....	IV
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	VI
<b>Capítulo I - Introdução</b>	
<b>1. Revisão bibliográfica – Schistosomose</b> .....	2
1.1 Etiologia.....	2
1.2 Epidemiologia .....	4
1.2.1 Ciclo de vida .....	4
1.2.2 Distribuição geográfica de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	6
1.2.2.1 No mundo.....	6
1.2.2.2 Em Portugal.....	6
1.3 Hospedeiro intermediário – <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	7
1.3.1 Características morfológicas gerais.....	7
1.3.2 Classificação Taxonómica .....	8
1.3.3 Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	10
1.3.4 Ciclo de vida de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	11
1.3.5 Alterações morfológicas de <i>Biomphalaria glabrata</i> após a penetração do parasita ..	12
1.4 Schistosomose : Patologia.....	13
1.5 Diagnóstico .....	13
1.6 Tratamento .....	14
1.7 Prevenção e controlo .....	15
1.8 Controlo do hospedeiro intermediário .....	16
1.8.1 Extratos vegetais utilizados neste trabalho.....	17
1.8.1.1 <i>Khaya senegalensis</i> .....	17
1.8.1.2 <i>Abrus precatorius</i> .....	19
1.9 Avaliação dos efeitos de toxicidade em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta aos extratos vegetais.....	20
<b>Capítulo II - Objetivos</b>	
<b>2. Objetivos</b> .....	23



2.1 Objetivo principal.....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
<b>Capítulo III - Material e Métodos</b>	
<b>3. Material e Métodos .....</b>	<b>25</b>
3.1 Origem do material vegetal.....	25
3.2. Obtenção dos extratos vegetais .....	25
3.3 Seleção dos moluscos, <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	26
3.4. Obtenção dos parasitas ( <i>Schistosoma mansoni</i> ).....	27
3.4.1 Obtenção de miracídios de <i>S. mansoni</i> .....	27
3.4.2 Exposição dos moluscos a miracídios de <i>S. mansoni</i> .....	28
3.5. Exposição dos moluscos aos extratos .....	28
3.5.1. Obtenção das cercárias .....	29
3.5.2. Monitorização da suscetibilidade dos moluscos à infeção .....	30
3.6 Modelo Murino .....	30
3.6.1 Infeção experimental.....	31
3.7. Avaliação de danos no DNA dos moluscos .....	31
3.8. Tratamento Estatístico.....	32
<b>Capítulo IV - Resultados</b>	
<b>4. Resultados .....</b>	<b>35</b>
4.1 Extratos utilizados.....	35
4.2 Sobrevivência e mortalidade de <i>B. glabrata</i> .....	35
4.3 Oviposição (número de posturas).....	38
4.4 Avaliação do número de cercárias eliminadas .....	42
4.5 Determinação de danos no DNA de <i>B. glabrata</i> .....	46
4.5.1 Avaliação do Teste Cometa .....	46
4.6 Infeção experimental de <i>Mus musculus</i> com cercárias de <i>S.mansoni</i> .....	48
<b>Capítulo V - Discussão</b>	
<b>5. Discussão .....</b>	<b>50</b>
<b>Capítulo VI - Conclusão</b>	
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>56</b>
<b>Capítulo VII - Referências Bibliográficas</b>	
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>58</b>
<b>Capítulo VIII - Anexos</b>	
<b>8. Anexos .....</b>	<b>71</b>

## **Lista de Abreviaturas**

**°C** – graus Celsius

**CD1** – cluster of differentiation 1

**CDC** – Centro de controlo e prevenção de doença

**cm** - centímetro

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** – “*Desoxyrribonucleic acid*”- Ácido desoxirribonucleico (ADN)

**EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

**ELISA** – Enzyme-linked immunosorbent assay

**g** – grama

**g** – g-force

**h** – hora

**IHMT** – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**KCl** – Cloreto de Potássio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** - Hidrogenofosfato de Potássio

**M** – molar

**mg** – miligrama

**mL** – mililitro

**mM** – Milimolar

**mm** – milímetro

**nº** - número

**NaCl** – Cloreto de sódio

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** – Hidrogenofosfato dissódico

**NaOH** – Hidróxido de sódio

**nm** - nanómetro

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PCR** – “*Polymerase Chain Reaction*” - Reação de Polimerase em cadeia

**pH** – potencial hidrogénio

**ppm** – partes por milhão

**PBS** – tampão fosfato-salino

**PZQ** – Praziquantel

**SCGE** – Single Cell Gel Eletrophoresis

**subsp.** – subespécie

**W** – Watts

**µL** – microlitro

**µg** – micrograma

## **Capítulo I – Introdução**

# 1. Revisão bibliográfica – Schistosomose

## 1.1 Etiologia

A schistosomose é uma parasitose que afeta atualmente mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo. O seu impacto social é tão elevado que em muitos países é considerada um importante problema de saúde pública (C.D.C., 2014). Por este motivo, a schistosomose foi definida pela Organização Mundial de Saúde (O.M.S) como a doença tropical mais devastadora em termos socioeconómicos e de saúde pública a seguir à malária. Apesar de uma crescente consciencialização, esta parasitose continua a ser uma doença tropical negligenciada (O.M.S., 2014). Os agentes etiológicos da schistosomose são tremátodes do género *Schistosoma*, sendo que nos seres humanos as principais espécies responsáveis por esta parasitose são *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum*. *S. haematobium* causa a forma urinária ou vesical e as restantes a schistosomose intestinal. (Rey, 2008). Na **Figura 1** está representada a classificação taxonómica do género *Schistosoma*.

**Reino:** Animalia

**Filo:** Platyhelminthes

**Classe:** Trematoda

**Subclasse:** Digenea

**Ordem:** Strigeidida

**Família:** Schistosomatidae

**Género:** *Schistosoma*

**Espécies:** *Schistosoma haematobium*, Bilhartz, 1852

*S. mansoni*, Sambon, 1907

*S. japonicum*, Katsurada, 1904

*S. intercalatum*, Fischer, 1934

*S. mekongi*, Voge, Brickner & Bruce, 1978

**Figura 1** - Classificação taxonómica do género *Schistosoma*.

A família Schistosomatidae é caracterizada por apresentar sexos separados e acentuado dimorfismo sexual (Chitsulo & Engels, 2000). *Schistosoma mansoni* é a única espécie de interesse médico e sanitário nas Américas, desenvolvendo a sua fase adulta como parasita dos vasos sanguíneos do homem e de outros mamíferos (Rey, 2008). O macho de *S. mansoni* mede cerca de 1 cm de comprimento e tem um corpo delgado e longo. Possui uma ventosa oral afunilada na extremidade anterior e abaixo desta, uma segunda ventosa pedunculada (**Figura 2**). O segmento anterior, situado entre as duas ventosas é cilíndrico e fino o segmento posterior é muito mais longo e achatado dorsoventralmente, mas enrolado de maneira a formar um tubo longitudinal denominado de canal ginecóforo (Rey, 2008). A fêmea tem um corpo mais fino e longo que o macho, medindo cerca de 1,5 cm de comprimento e apresenta uma cor mais escura (**Figura 2**). Os seus ovários situam-se no terço anterior do corpo precisamente antes da união dos dois cegos enquanto o útero é curto e só pode conter 4 ovos (Lambert, 1973).



**Figura 2** – *Schistosoma mansoni* (macho e fêmea)  
Original de Hélder Fernandes, 2014

Os ovos de *Schistosoma mansoni* (**Figura 3**) são os que apresentam maiores dimensões (115-175  $\mu\text{m}$  x 45-70  $\mu\text{m}$ ) em comparação com os de outras espécies de *Schistosoma* (Davis, 2003). Possuem uma casca dupla, com uma espícula lateral saliente e aguda (característica desta espécie) situada no polo posterior que é comparativamente mais volumoso que o polo anterior (mais delgado) (Rey, 2008).



**Figura 3** – Ovo de *Schistosoma mansoni*.  
Grupo de Helminologia e Malacologia Médicas, IHMT

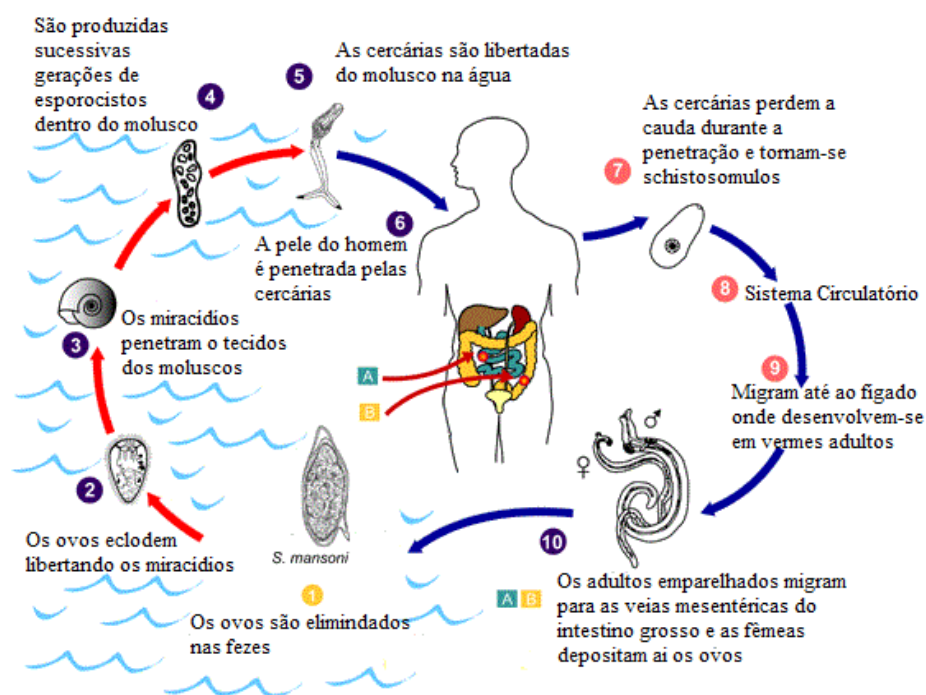
## 1.2 Epidemiologia

### 1.2.1 Ciclo de vida

A primeira fase no ciclo de vida de *S. mansoni* caracteriza-se pela eliminação de ovos nas fezes, os quais já possuem o sexo determinado dos parasitas resultantes. Quando os ovos chegam em condições favoráveis a uma coleção de água doce superficial, libertam os miracídios, larvas móveis ciliadas, que nadam até encontrar o molusco gastrópode de água doce, hospedeiro intermediário, que penetram através do tegumento (Rey, 2008) (**Figura 4**). Nos tecidos do molusco, os miracídios perdem o epitélio ciliado e transformam-se em esporocistos mãe, produzindo por *poliembrionia* esporocistos filhos. Estes, por sua vez, vão migrar para o hepatopâncreas, onde se continuam a reproduzir de forma assexuada (Thompson *et al.*, 1997). A última geração de esporocistos vai dar origem às larvas infetantes para o hospedeiro definitivo, as cercárias, que apresentam uma cauda bifurcada. Estas, em condições ideais de calor e luminosidade, vão libertar-se do molusco para a água, nadando rapidamente até encontrar o hospedeiro vertebrado (ser humano ou outro animal suscetível). A cauda é descartada aquando da penetração na pele e a cercária transforma-se em schistosómulo

(**Figura 4**). Os schistosómulos vão migrar através da corrente sanguínea até ao seu habitat preferido no sistema venoso do hospedeiro definitivo onde vai ocorrer a maturação em parasitas adultos (Ivanchenko, 1999).

Os machos e fêmeas adultos acasalam nos vasos do sistema porta, e quando migram para o plexo venoso mesentérico do intestino já se encontram emparelhados e aí a fêmea põe os ovos 35 dias após a infeção (Rey, 2008). A maior parte dos ovos será expulsa do organismo através das fezes e estes quando em contacto com a água vão dar origem a um novo ciclo. Contudo, alguns ovos vão permanecer na corrente sanguínea, podendo migrar para o fígado o que vai desencadear uma reação inflamatória por parte do organismo do hospedeiro culminando com a formação de granulomas neste (**Figura 4**) (Chiodini, 2001). Cinco anos é a média de vida de *S. mansoni*, embora em alguns casos possam viver mais de 30 anos a eliminar ovos (Ross *et al*, 2002; Gryseles *et al*, 2006).



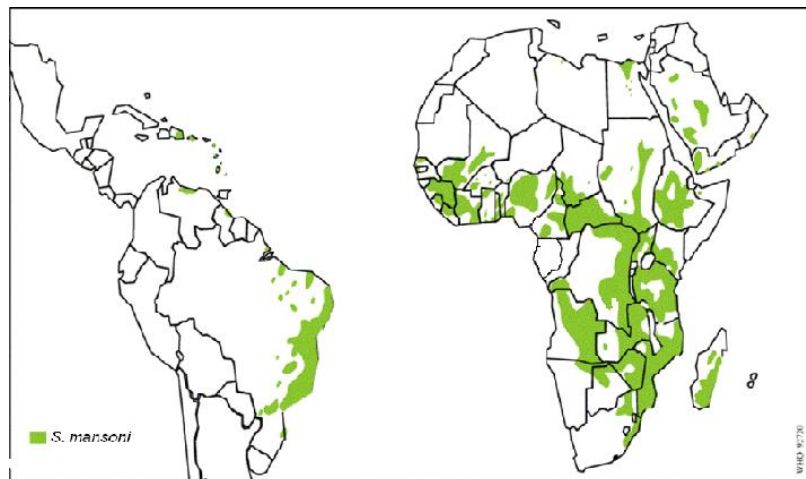
**Figura 4** – Ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*.  
Adaptado de Centro de controlo e prevenção de doença (C.D.C), 2014



## 1.2.2 Distribuição geográfica de *Schistosoma mansoni*

### 1.2.2.1 No mundo

A schistosomose causada por *S. mansoni* é uma doença autóctone de África onde os seus maiores focos são no Delta do rio Nilo e na faixa intertropical ao Sul do Saara. Os países mais atingidos são o Egito, o Sudão, a República Centro- Africana e Madagáscar. Na Ásia só a Arábia Saudita, o Iêmen e Oman apresentam focos desta doença. No continente Americano ela está presente em países como o Brasil e Venezuela, além de territórios no Suriname, Porto Rico, República Dominicana e em algumas das Pequenas Antilhas (Rey, 2008) (**Figura 5**).



**Figura 5** – Distribuição global de *Schistosoma mansoni*.  
Adaptado de Organização Mundial de Saúde (O.M.S), 2012

### 1.2.2.2 Em Portugal

Embora Portugal nunca tenha tido casos autóctones de pessoas infectadas com *Schistosoma mansoni* já teve casos de Schistosomose por *Schistosoma haematobium*. O primeiro registo ocorreu no ano de 1921 em Tavira na região do Algarve (Basto, 1921, cit Simões & Medeiros, 1980). Em 1923 surgiram mais casos em Alportel e em 1925 em Estoi (Azevedo, 1948). Em 1922, Bettencourt e colaboradores verificaram que o

molusco responsável pela transmissão de *S. haematobium* em Portugal pertencia à espécie *Planorbarius metidjensis*. Nos anos seguintes 1933, 1935 e 1938 surgiram novos casos em Minas de S. Domingos, Fuzeta e Caldas de Monchique (Azevedo *et al.*, 1948). Só no ano de 1960 é que a O.M.S declarou esta parasitose como erradicada em Portugal (Azevedo *et al.*, 1969).

### 1.3 Hospedeiro intermediário – *Biomphalaria glabrata*

#### 1.3.1 Características morfológicas gerais

Os moluscos da espécie *B. glabrata* (**Figura 6**) são um dos mais eficientes hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni*, devido ao seu elevado grau de especificidade para com este parasita (Rey, 2008).

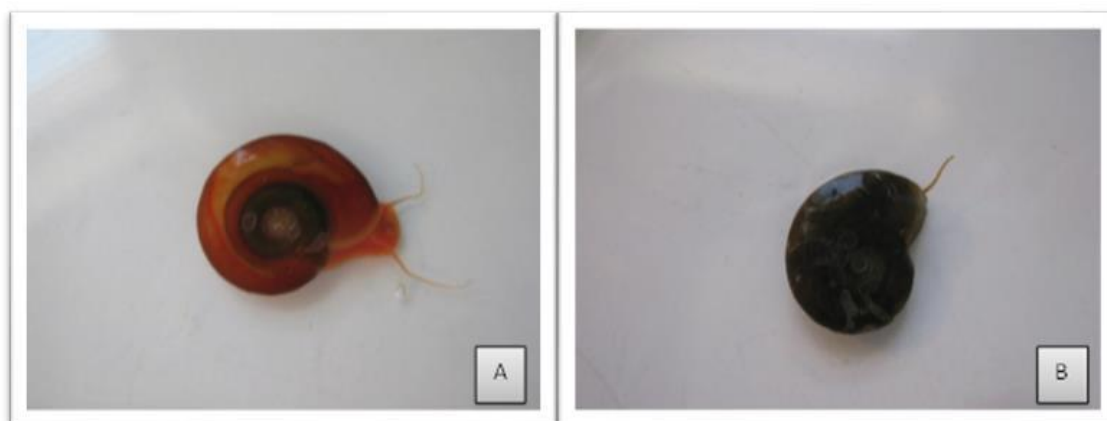
Os moluscos pertencentes ao género *Biomphalaria* apresentam uma concha discoidal, que pode medir até 40 mm de diâmetro e 11 mm de largura, apresentando-se por vezes fortemente mineralizada e com uma função protetora (Ruppert *et al.*, 2005). Esta concha funciona como abrigo permanente de uma parte do corpo do molusco onde se encontram as vísceras envolvidas pelo manto. O manto é uma cavidade contínua, que abriga a maioria dos órgãos do molusco. A cavidade paleal, localizada na parte interna do manto, comunica com exterior através de um sifão designado por pneumóstoma, constituindo deste modo o sistema respiratório, do tipo aeróbio (Rey, 2011). A superfície ventral do corpo do molusco é ocupada por um pé muscular que adere e move o animal sobre superfícies de substratos firmes (Barbosa *et al.*, 1995).

O sistema digestivo é completo, sendo constituído pela boca, cavidade bucal, faringe, esófago, estômago, intestino, ceco, reto e ânus. No interior do saco bucal encontra-se a rádula, que tem como função raspar os substratos duros e remover algas e outros detritos. Este género é considerado fundamentalmente herbívoro (Paraense, 2008).

O sistema circulatório é constituído por um coração, contido no pericárdio onde circula a hemolinfa de cor vermelha (devido à hemoglobina dissolvida), um sistema arterial e venoso e um sistema de seios sanguíneos. (Baker, 1945; Ruppert *et al.*, 2005).

O sistema nervoso é cefalizado e bem desenvolvido, sendo constituído por pares de gânglios que formam um anel em torno do esófago, logo atrás do saco bucal (Ruppert *et al.*, 2005; Rey, 2011). A nível do sistema excretor, a excreção é feita pelo rim, onde se

observa uma prega mucosa saliente denominada de crista renal (Rey, 2011; Neves 2011). Sendo animais hermafroditas, o seu sistema reprodutor é constituído por uma glândula hermafrodita (ovotestis) e um canal hermafrodita (ovoespermático). Apresentam ainda duas genitálias, uma feminina e outra masculina (Paraense, 2008).



**Figura 6** –*Biomphalaria glabrata* (A- estirpe albina; B- estirpe selvagem)  
Original de Hélder Fernandes, 2014

Além destas características comuns ao género, os moluscos desta espécie possuem algumas características internas específicas, tais como a presença de uma crista renal pigmentada ao longo da superfície ventral do tubo renal (em forma de J) no caso dos moluscos adultos e uma linha renal pigmentada no caso dos moluscos jovens. Também apresentam uma glândula hermafrodita (ovotestis) com mais de 350 divertículos, uma bolsa vaginal e a porção média da bainha do pénis é aproximadamente do mesmo diâmetro que a porção mais larga do canal deferente (Coelho, 1995).

### 1.3.2 Classificação Taxonómica

A espécie *Biomphalaria glabrata* pertence ao filo Mollusca e à classe Gastropoda. (Figura 7). Esta classe tem grande importância em medicina humana por incluir moluscos de água doce que desempenham um importante papel como hospedeiros intermediários de tremátodes mas também de outros helmintas patogénicos para os seres humanos (Guerreiro, 1993; Grácio, 2008).

São reconhecidas 34 espécies dentro do género *Biomphalaria* e que se encontram agrupadas em dois grandes grupos com base na sua distribuição geográfica: as americanas (Neotropical) e as africanas (Africanas) (DeJong, 2001; Jorgensen, 2004) (**Figura 7**). As espécies do género *Biomphalaria* podem distinguir-se através de características morfológicas da concha, dos órgãos reprodutores masculinos e femininos e da rádula (Caldeira, 2000; Jorgensen, 2004).

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Classe: Gastropoda

Subclasse: Pulmonata

Ordem: Basommatophara

Família: Planorbidae

Género: *Biomphalaria*

**Espécies americanas**

*B. glabrata* (Say)  
*B. tenagophila* (D'Orbigny)  
*B. straminea* (Dunker)  
*B. philippiana* (Dunker)  
*B. chilensis* (Dunker)  
*B. albicans* (Pfeifferi)  
*B. riisei* (Clessin)  
*B. peregrina* (D'Orbigny)  
*B. helophila* (D'Orbigny)  
*B. obstructa* (Merelet)  
*B. pallida* (Adams)  
*B. havanensis* (Pfeifferi)  
*B. fieldii* (Tryon)  
*B. scharmmi* (Crosse)  
*B. prona* (Martens)  
*B. occidentalis* (Paraense)  
*B. andecola* (D'Orbigny)

**Espécies africanas**

*B. pfeiffiri* (Krauss)  
*B. choanomphala* (Martens)  
*B. alexandrina* (Ehrenberg)  
*B. sudanica* (Martens)

**Figura 7** – Classificação taxonómica das espécies do género *Biomphalaria*.

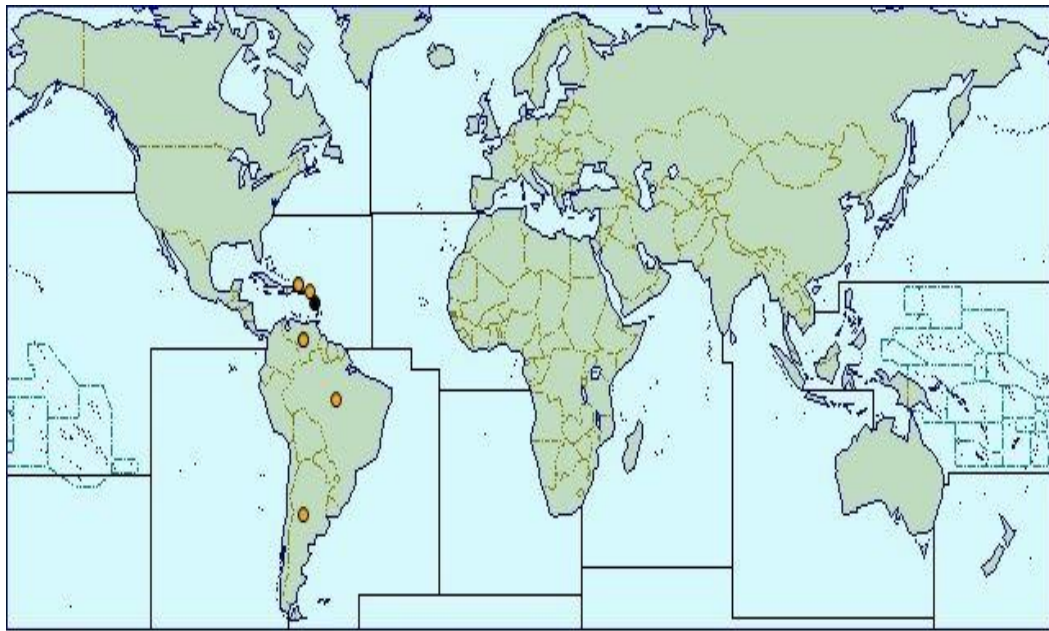
### 1.3.3 Distribuição geográfica de *Biomphalaria glabrata*

A distribuição geográfica dos moluscos do género *Biomphalaria* está associada a fatores climáticos, sejam eles térmicos ou sazonais, quer sejam hídricos ou orográficos (Deschiens, 1954, Malek, 1980, Pointier, 1982). Os habitats de eleição deste planorbídeos são águas ricas em sais alcalinos, pouco movimentadas, ricas em vegetação aquática e expostas ao sol, com temperaturas ótimas entre os 22°C e 26°C (Schwetz, 1951). A vegetação submersa constitui um apoio para estes moluscos, que nela se fixam e se alimentam. A alimentação é à base de folhas e outros órgãos de plantas aquáticas, algas, bactérias, etc. (Neves, 2011).

Com uma biologia bem adaptada para viver em áreas onde podem passar por períodos de seca ou estiagens, em estivação ou anidrobiose, por suportarem condições desfavoráveis do meio, em condições adequadas de luz, temperatura e pH podem reproduzir-se durante todo o ano, permitindo a manutenção dos habitats e até colonizar outros (Rey, 2004; Malek, 1980).

Os seus habitats podem ainda situar-se em áreas de ocupação humana, principalmente, em locais onde as condições sanitárias da população são precárias, onde não existe rede de tratamento de esgotos. Em áreas rurais, estes moluscos podem encontrar-se em locais destinados à agricultura de irrigação, representando um importante hospedeiro intermediário para *S. mansoni* (Rey, 2004).

Esta espécie pode ser encontrada nas Caraíbas (Haiti, República Dominicana, Porto Rico, Monserrate, Ilha de Guadalupe, Martinica, Santa Lúcia, Antígua e Barbuda e Jamaica) e também na América do Sul (Brasil, Venezuela, Guiana Francesa e Suriname) (Malek & Cheng, 1974; Pointier, 1993) (**Figura 8**). Embora haja relatos recentes de que esta espécie possa ter colonizado novas áreas, por outro lado, existe uma redução na sua abundância nas Caraíbas não só devido à competição com outras espécies não autóctones, ou seja, espécies introduzidas, bem como a alteração dos habitats devido às alterações ambientais e climáticas (Morgan *et al.*, 2001; Pointier, 2005).



**Figura 8** – Distribuição global de *Biomphalaria glabrata* (Neotropical)  
Adaptado de <http://www.cabi.org>, 2014

#### 1.3.4 Ciclo de vida de *Biomphalaria glabrata*

Os membros do género *Biomphalaria* são essencialmente diploides ( $2n$ ), desde a formação do ovo, fases juvenis e adulto até à produção das células sexuais haploides ( $n$ ), de cuja reunião resulta o ovo (Guerreiro, 1993). São hermafroditas com capacidade de se reproduzirem por autofecundação, porém, a reprodução por fecundação cruzada, resulta em maior número de descendentes (Neves, 2011; Rey, 2004; Vidigal, 1998). A postura dos ovos é efetuada em geral à noite, depositando dezenas de ovos, que permanecem envoltos por uma membrana, a cápsula ovífera, que por sua vez é segregada pela glândula nidimental, (Rey, 2008). As posturas são depositadas em qualquer estrutura sólida submersa, tais como, plantas, madeira, pedras, conchas de outros moluscos e até mesmo restos de materiais encontrados nas coleções de água

poluída (Neves, 2011). A eclosão ocorre aproximadamente 7 dias após a postura. O desenvolvimento e o tamanho máximo alcançado pelo caracol adulto está diretamente relacionado com a densidade populacional e as condições da água (Neves, 2011).

### **1.3.5 Alterações morfológicas de *Biomphalaria glabrata* após a penetração do parasita**

Os estádios larvares de *Schistosoma mansoni* (miracídeos, esporocistos e cercárias) são responsáveis por lesões mecânicas, fisiológicas e até morfológicas no interior do molusco (Malek, 1980). As alterações mecânicas são o resultado das migrações das larvas ao longo dos vários tecidos para atingirem os órgãos distais do molusco e as alterações fisiológicas são causadas pelo consumo de alimentos digeridos e pela acumulação de substâncias tóxicas que os parasitas excretam (Faust, 1929). De acordo com Brumpt (1940), as lesões morfológicas são causadas pela transformação dos miracídeos em esporocistos primários nos tentáculos, cabeça, pé e manto dando origem a pequenos tumores visíveis a olho nu. Também a infecção por *S. mansoni* afeta a capacidade reprodutora do molusco, devido à destruição gradual do ovotestis, levando a uma redução do número de posturas. A infecção é ainda responsável por alterações de crescimento e do ciclo de vida dos moluscos, podendo causar morte prematura (Coelho, 1954).

A infecção natural de *B. glabrata* é por vezes bastante intensa, podendo atingir taxas semelhantes à infecção experimental (100%), dependendo dos locais de contaminação, dos fatores ambientais e acima de tudo, de um conjunto complexo de fatores genéticos que determinam ou não o desenvolvimento ou a inibição do parasita no molusco (Newton, 1952).

Os moluscos apresentam mecanismos de defesa contra a invasão dos parasitas, principalmente, por fagocitose e o encapsulamento (Malek, 1980). Em espécies resistentes ao parasita, os miracídeos e os esporocistos são na sua maioria, envolvidos por reação celular e destruídos por fagocitose (Newton, 1952). As células implicadas nessa destruição são amebócitos, ou seja, macrófagos primitivos, que circulam livremente no interior da hemolinfa do caracol e podem acumular-se em regiões específicas em volta dos esporocistos (Borges, 1998).

## 1.4 Schistosomose: Patologia

A maior parte das pessoas não apresenta sintomas logo após serem infectadas. Mas, passados alguns dias, podem manifestar algum prurido, dermatite ou outras manifestações alérgicas resultantes da penetração das cercárias na pele (C.D.C, 2014). Entre 1 a 2 meses pós-infecção, em virtude do estabelecimento do parasita na fase aguda, podem ocorrer hemorragias durante o seu percurso de migração e ainda a formação de granulomas no intestino e fígado, causando sintomas variados como febre, mal-estar, dores abdominais, diarreia, entre outros. Em certos casos a febre pode ser o único sintoma inicial durando de alguns dias a algumas semanas (Rey, 2008).

Na ausência de tratamento, a schistosomose pode persistir durante anos, tornando-se assim crônica. Nesta fase da doença a sintomatologia deve-se essencialmente à acumulação de granulomas com incidência no fígado, levando a um aumento do tamanho e redução do fluxo sanguíneo neste órgão. Esta situação vai dar origem a hipertensão portal provocando um aumento do tamanho do baço. Em casos raros os ovos podem alojar-se no cérebro ou na espinal medula provocando paralisia, lesões cerebrais, inflamação da espinal medula ou aneurismas cerebrais (Reimert *et al*, 2008; Rey, 2008; C.D.C, 2014).

## 1.5 Diagnóstico

Considerando que a sintomatologia da schistosomose é inespecífica e vaga, só com provas laboratoriais é possível obter elementos seguros que permitam fazer um diagnóstico correto da doença. Para o efeito são utilizados dois tipos de exames: os exames diretos e os exames indiretos. O exame direto mais utilizado é a pesquisa de ovos nas fezes e apresenta-se como o principal método de diagnóstico no caso de *Schistosoma mansoni* e nos exames de rotina. Os ovos desta espécie são grandes e característicos não sendo necessários outros recursos para a sua visualização a não ser um microscópio normal. (C.D.C, 2014).

No caso dos exames indiretos, estes são pouco utilizados em serviços de rotina estando restritos apenas a situações que ocorram em áreas de prevalência reduzida e com cargas parasitárias pequenas associadas a uma baixa eficiência do exame de



pesquisa de fezes. As técnicas de *Enzyme-linked immunosorbent assay* e *Western-blot* são alguns dos exemplos de exames indiretos utilizados no diagnóstico (Rey, 2008; C.D.C, 2014). Nos últimos anos, o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) veio contribuir para um diagnóstico mais eficaz, pois esta é uma técnica laboratorial que permite uma rápida seleção, isolamento amplificação e posterior sequenciação do DNA a partir de pequenas quantidades da amostra (McManus & Bowles, 1996). Apesar do custo e complexidade técnica da mesma constituírem ainda alguns dos fatores limitantes para que o seu uso se torne generalizado, esta poderá ser uma técnica ideal para ser aplicada em zonas de infeções com baixa carga parasitária e para casos de controlo do tratamento com praziquantel (Neves *et al*, 2010).

## 1.6 Tratamento

O primeiro fármaco a ser utilizado no tratamento da schistosomose foi o Tártaro Emético em 1918, seguindo-se outros antimoniais e nitrofuranos, mas a sua utilização foi descontinuada devido aos baixos níveis de cura ou aos efeitos colaterais (Asfora & Domingues, 1975).

Em 1964, foi introduzido o Niridazol que embora fosse moderadamente eficaz e de fácil utilização (dada a sua administração oral) acabou por revelar uma intensa neurotoxicidade razão pela qual foi cessada a sua utilização (Katz, 1977; Cioli *et al.*, 1995). No ano seguinte, em 1965, apareceu o Hycanthone, que, apesar dos bons resultados e ser de fácil aplicação (através de uma única injeção intramuscular), contudo apresentava efeitos secundários diversos tornando-se também numa opção inviável (Asfora & Domingues, 1975).

Foi preciso esperar até 1969 para aparecer um caso de relativo sucesso: a Oxamniquina. Este fármaco é eficaz para um tratamento individual ou em larga escala mas só no tratamento de *Schistosoma mansoni*. O facto de ser ineficaz no tratamento de outras espécies do género *Schistosoma*, bem como o seu elevado custo, efeitos colaterais significativos e sucessivos relatos de resistência tem levado a uma redução progressiva na utilização deste fármaco embora ainda seja utilizado nos dias de hoje no tratamento de *Schistosoma mansoni* (Cioli *et al.*, 1995).

Foi em 1970 com a introdução do fármaco Praziquantel (PZQ) que finalmente se deu uma melhoria significativa na eficácia do tratamento contra a *Schistosomose*. Este fármaco é administrado numa dose única, por via oral apresentando uma atividade terapêutica elevada, bem como uma redução na morbilidade. Contudo os resultados deste fármaco não têm sido tão bons quanto o esperado porque não atua em formas jovens do parasita e têm vindo a ser reportados sucessivos casos em que foi necessário aumentar a dose terapêutica (Gryseels *et al.*, 2001; Fenwick & Webster, 2006). Esta possível resistência tem surgido principalmente em áreas endémicas de schistosomose em que a população necessita de ser submetida a tratamentos sequenciais, que pode proporcionar, assim, a possibilidade de seleção de linhagens de *S. mansoni* resistentes aos fármacos tal como foi demonstrado por Rogers e Bueding em 1971 (Gryseels *et al.*, 2001).

Estes sucessivos casos de resistência ou tolerância ao Praziquantel servem de alerta para a procura de novos fármacos eficazes na prevenção e cura da schistosomose. Nestes últimos anos ainda não foi encontrado um substituto para o Praziquantel embora tenham surgido novos fármacos com resultados promissores em moluscos infetados com *Schistosoma mansoni* como a Miltefosina (já utilizada no tratamento da Leishmaniose) falta ainda a avaliação dos mesmos na terapêutica clínica. (Eissa *et al.*, 2011).

## **1.7 Prevenção e controlo**

A schistosomose continua a ser um grave problema de saúde pública, apesar da existência de métodos de diagnóstico e terapêutica para esta parasitose. Tanto a prevenção como o controlo da schistosomose dependem não só da área e espécies específicas como também dos métodos intervencionais a serem utilizados (Davis, 2003). Por este motivo o controlo da schistosomose direciona-se sobre dois aspetos fundamentais: a morbilidade e a transmissão. Enquanto, o controlo da morbilidade visa a diminuição do aparecimento de formas graves, considerando apenas o diagnóstico e o tratamento como métodos suficientes, o combate à transmissão visa interromper o ciclo evolutivo e a implementação da engenharia sanitária (Katz, 1999). As estratégias de controlo baseiam-se assim em programas públicos de saneamento básico, educação

sanitária, controlo do hospedeiro intermediário e tratamentos das pessoas infetadas (Brooker *et al.*, 2006). O abastecimento de água tratada, a implementação de instalações sanitárias e o destino adequado dos esgotos sanitários, são os recursos básicos de saneamento que em conjunto com a educação sanitária, constituem o melhor método de controlo da schistosomose a médio e longo prazo (Berquist, 2002; Fenwick *et al.*, 2006).

### **1.8 Controlo do hospedeiro intermediário**

O controlo do molusco, hospedeiro intermediário, tem-se mostrado difícil, devido à sua elevada capacidade de reprodução, capacidade de repovoar novos habitats antes e após tratamento, alimentação omnívora, adaptações respiratórias que lhes possibilitam uma melhor adaptação a habitats aquáticos e terrestres, resistência à dessecação e comportamentos de proteção que possibilitam um escape às medidas de controlo (Jurberg, 1989; Souza & Lima, 1970).

Nas últimas décadas a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1983), tem vindo a recomendar como uma medida de controlo alternativas a pesquisa de novos extratos vegetais que possuam propriedades moluscidas e que possam ser aplicados na natureza sem provocar desequilíbrio no meio ambiente. Face a esta perspetiva, diferentes estudos sobre a bioatividade de produtos naturais e a sua capacidade de alterar o comportamento biológico dos moluscos infetados e não infetados, têm apresentado resultados promissores em estudos laboratoriais (Bezerra *et al.*, 2002).

Os moluscidas sintéticos são “virtualmente” restritos a um único composto designado por niclosamida (Bayluscide®) e embora existam outros compostos químicos letais para os moluscos a sua utilização atual é mínima (Davis, 2003). Embora a niclosamida seja altamente eficaz por apresentar alta toxicidade nos moluscos, é relativamente cara e afeta também os peixes e outros pequenos animais tendo um impacto bastante negativo na fauna e flora aquáticas das áreas circundantes (Singh *et al.*, 2009). Assim, procura-se moluscidas mais baratos e com um menor grau de impacto na natureza. Os compostos de origem vegetal, em particular de plantas comuns nas regiões endémicas, seriam desejáveis por poderem ser obtidos facilmente a baixo custo pelas populações de baixo rendimento. Estão descritos muitos moluscidas de origem vegetal que apresentam não só altos níveis de toxicidade só para os moluscos como um

baixo custo económico e facilidade de produção em países em via de desenvolvimento. Contudo, as dificuldades surgem no cultivo de muitas das plantas necessárias de modo a que haja uma produção suficiente a aplicar num programa de controlo em escala nacional ou nas técnicas de extração, conservação e comercialização dos compostos ativos necessários (Rey, 2008).

Para além do efeito moluscicida, ou como alternativa, tem-se procurado compostos naturais que atuem no parasita durante a sua fase larvar no hospedeiro intermediário, nomeadamente os moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Assim, têm sido realizados bioensaios de compostos naturais que possam impedir o desenvolvimento das fases larvares intra molusco (esporocistos) e as fases larvares de vida livre (cercárias e miracídeos) do parasita, *Schistosoma mansoni*. Algumas plantas apresentam substâncias eficazes no controlo dos moluscos e cercárias, ou seja, têm capacidade de interromper o ciclo evolutivo de *S. mansoni* (Carvalho, *et al*, 1998; Ruppel, 2000).

### **1.8.1 Extratos vegetais utilizados neste trabalho**

Desde há muito que as plantas medicinais são utilizadas como fármacos pelas comunidades rurais. No entanto, só no século XX, foram realizados estudos científicos sobre a sua eficácia. Foram também utilizados novos métodos de extração química aos compostos ativos presentes nas plantas. Contudo, muitas vezes os extratos purificados, apesar de atuarem mais rapidamente, não tinham um efeito tão longo no tempo nem tão completo quanto o das plantas naturais, pelo que foram propostos métodos de estabilização dos extratos das plantas medicinais frescas com recurso a etanol ou metanol por exemplo, especialmente no caso de plantas com componentes mais instáveis (MacDonald, 1995; Petrovska, 2012). Para avaliar o efeito antiparasitário ou até moluscicida, foram selecionados vários extratos, dos quais falaremos apenas de dois deles, por serem autóctones de diferentes regiões de África e já terem sido utilizados no combate a doenças parasitárias.

#### **1.8.1.1 *Khaya Senegalensis***

*Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. é uma árvore da família Meliaceae, nativa de África, estando presente nos seguintes países : Camarões, Costa do Marfim, Gambia, Gana, República Centro- Africana, Gabão, Chade, Guiné, Guiné-Bissau, Mali, Níger,

Nigéria, Senegal, Serra Leoa, Sudão, Togo, e Uganda. É também uma espécie exótica na Austrália, Cuba, Índia, Indonésia, Vietname, Porto Rico, África do Sul e Singapura (Nikiema & Pasternak, 2008) (**Figura 9**). Encontra-se sobretudo em florestas abertas, savanas arborizadas, galerias florestais e em margens de rios e embora seja uma planta relativamente difícil de encontrar é mais abundante nos dias de hoje, devido à regeneração dos matos, podendo ser colhida em qualquer época do ano (Indjai *et al.*, 2008).

O extrato da casca desta árvore é muito utilizado na medicina tradicional em doenças como a malária, varicela ou lepra, por exemplo. É também utilizado como anti-helmíntico principalmente em medicina veterinária (Koné, 2011). Outros materiais vegetais desta planta também são utilizados tais como as flores, raízes e folhas no tratamento de dores de cabeça, anemia, diarreia, úlceras, doenças de pele, entre outros sintomas (Burkill, 1997).



**Figura 9** – *Khaya senegalensis*

Adaptado de <http://www.africanplants.senckenberg.de>, 2014

Já foram realizados vários estudos relativamente às propriedades farmacológicas desta planta. Adebayo e colaboradores (2002) estudaram o efeito de extratos etanólicos da casca de *Khaya senegalensis* em parâmetros bioquímicos dos rins de ratos, tendo concluído que a sua sucessiva administração apresentava toxicidade renal. Maiga e colaboradores (2005) recolheram dados sobre a toxicidade das plantas utilizadas em Bamako, no Mali com a ajuda de testemunhos da população local e da literatura disponível na zona. Reportaram que a casca do caule da *Khaya senegalensis* é utilizada como veneno para peixes e como um dos ingredientes na criação de setas envenenadas.

Em laboratório, o extrato em álcool da casca do caule de *K. senegalensis* provocou uma diminuição da atividade locomotora de ratos e protegeu 70 % destes contra convulsões induzidas por leptazol, enquanto o extrato metanólico demonstrou atividade antibacteriana contra *Pseudomas aeruginosa* e contra *Leishmania donovani*. Koné e colaboradores (2011), mostraram que o extrato etanólico da casca de *Khaya senegalensis* causava a morte de vermes adultos de *S. mansoni* 24 horas após a exposição, foi também eficaz contra vermes adultos de outros helmintas, como *Ancylostoma ceylanicum*.

#### 1.8.1.2 *Abrus precatorius* subsp. *africanus*

*Abrus precatorius* subsp. *africanus* L. (**Figura 10**) é uma pequena planta trepadora lenhosa da família *Fabaceae*, nativa de África que se encontra em países como o Sudão, Quênia, Tanzânia, Uganda, Níger, Zimbábwe, Guiné-Bissau, Namíbia, Botswana, Togo e Ruanda. Também existe nas ilhas de Madagáscar e Seychelles Cresce principalmente em florestas abertas e savanas arborizadas. Esta espécie é facilmente obtida na época das chuvas, pois na época seca perde as folhas, em alternativa são utilizadas as suas raízes (Indjai *et al.*,2008).

Tanto os extratos das folhas como da casca, sementes e raízes desta planta são muito utilizados na medicina tradicional no tratamento de doenças como a raiva, tétano e doenças parasitárias, entre outras. Também é usada no tratamento de feridas, problemas de infertilidade, febre, dores de cabeça e problemas intestinais.



**Figura 10** – *Abrus precatorius* subsp. *africanus*  
Adaptado de <http://www.africanplants.senckenberg.de>, 2014

Já foram realizados vários estudos que demonstram atividade moluscicida de extratos desta planta. Singh e colaboradores (1998) testaram extratos etanólicos de raízes e de sementes de *Abrus precatorius* e moluscos da espécie *Lymnaea acuminata*. A toxicidade do extrato para os moluscos dependia da concentração utilizada, bem como do tempo de exposição, mas não afetava alguns peixes como por exemplo os da espécie *Colisa fasciatus*. Foram também observadas propriedades antischistosoma nos extratos etanólicos das raízes.

Um estudo utilizou material vegetal obtido a partir das folhas e raízes em vermes adultos de *S. mansoni* e de outros parasitas (Mølgaard *et al*, 2000). O extrato das raízes de *Abrus precatorius* demonstrou ser o mais eficaz contra os vermes adultos de *S. mansoni* levando à morte dos mesmos 1 hora após a aplicação (Mølgaard *et al*, 2000).

Em 2009, Pal e colaboradores, realizaram um estudo *in vitro* sobre a atividade antioxidante dos compostos extraídos das sementes de *Abrus precatorius*. Os resultados indicaram que os componentes que conferem um carácter antioxidante aos extratos etanólicos das sementes foram os fenóis e os flavonoides e que deste modo o extrato poderia ser utilizado na prevenção e tratamento de doenças como um poderoso antioxidante. Bhatia e colaboradores (2013), numa revisão da literatura, referem que os extratos aquosos do caule e da raiz de *Abrus precatorius* têm elevada atividade anti-helmíntica, em particular contra os schistosómulos de *S. mansoni* e no cestode *Hymenolepis diminuta*.

## **1.9 Avaliação dos efeitos de toxicidade em**

### ***Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos vegetais**

Testes que possam avaliar os danos no material genético através da deteção de alterações no DNA, são considerados testes sensíveis para ensaios de genotoxicidade (Gustavino, 2005). O *Comet Assay*, (Ensaio Cometa) também conhecido como SCGE (Single-Cell Gel Electrophoresis), é uma técnica capaz de detetar dano no DNA em células individualizadas. Atualmente, este método é o mais utilizado na medição de danos no DNA de células eucariotas e tecidos desagregados. Por este motivo foi a técnica de eleição utilizada neste trabalho para medir o dano no DNA das células do

molusco *B. glabrata* a fim de verificar se os extratos utilizados no presente trabalho tinham ou não efeito moluscicida sobre os moluscos em causa. (Collins, 2004).

A técnica baseia-se na separação e fixação de células em agarose, onde são lisadas e subsequentemente submetidas a eletroforese. O DNA libertado do núcleo migra de acordo com o tamanho dos fragmentos, podendo causar arrastamento (semelhante à cauda de um cometa) e que pode ser observado através de microscopia de fluorescência (Tice, 2000). O comprimento da cauda dos “cometas” comparativamente com a sua origem determina o grau do dano existente no DNA de cada núcleo, podendo ser feito através de uma contagem manual ou automática com o auxílio de um software apropriado (Azqueta & Collins, 2011).



## **Capítulo II – Objetivos**

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo principal

A aplicação de medidas integradas utilizando diversos recursos, tais como, o tratamento das populações parasitadas através da quimioterapia, a educação sanitária, saneamento básico e o controlo das populações de moluscos hospedeiros intermediários, visam um controlo mais eficaz da schistosomose. Visando encontrar estratégias de controlo dos moluscos, este estudo pretende clarificar o papel de alguns extratos vegetais enquanto inibidores do desenvolvimento do parasita na fase intra molusco. Neste contexto, o trabalho agora proposto tem como objectivo principal avaliar a actividade biológica de extractos vegetais oriundos da Guiné-Bissau em *Biomphalaria glabrata* exposta a *Schistosoma mansoni*.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Selecionar os extratos vegetais
- b) Avaliar a sua ação como potenciais inibidores do desenvolvimento intra-molusco.
- c) Utilizar o sistema biológico *B. glabrata*/*S. mansoni* como modelo experimental para a avaliação dos extratos nos seguintes parâmetros:
  - i. Sobrevivência/mortalidade;
  - ii. Capacidade reprodutiva;
  - iii. Eliminação de cercárias
  - iv. Infeciosidade das cercárias em murganhos (hospedeiro definitivo)
- d) Avaliar os efeitos de toxicidade em *B. glabrata*, causados pela exposição aos extratos, utilizando a técnica de *Comet Assay*.

## **Capítulo III – Material e Métodos**

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Origem do material vegetal

Dos 41 extratos previamente preparados foram apenas seleccionados dois relativos às plantas das espécies *Abrus precatorius* e *Khaya senegalensis* com origem na ilha de Orango na Guiné-Bissau, cedidas gentilmente pelos Doutores Luís Catarino (JBT – IICT/CIBIO) e Bucar Indjai (INEP – Guiné-Bissau), tendo sido numeradas com os números 17 e 22 respetivamente. A escolha destes extratos prende-se com o facto de já terem sido descritos em vários estudos como bons antihelmínticos. O material vegetal foi composto por folhas que tinham sido secas à temperatura ambiente e na ausência de luz.

#### 3.2. Obtenção dos extratos vegetais

Obtiveram-se extratos brutos metanólicos das folhas de *A. precatorius* e de *K. senegalensis* de acordo com o protocolo de Fernandez *et al*, (2008) que pode ser resumido nos passos que se seguem. A 250 mg de material vegetal de cada uma das plantas, em triplicado, adicionou-se 5 ml de metanol em tubos que foram vedados e mantidos à temperatura ambiente e no escuro durante dois dias. O líquido foi transferido para tubos de polipropileno e deixados a secar à temperatura ambiente até evaporar completamente e do qual se determinou o peso do depósito (**Tabela 1**). Adicionou-se DMSO (solvente) para uma solução-mãe de 50 mg/ml a partir da qual se definiu a concentração de 500 ppm utilizada no primeiro ensaio.

**Tabela 1** - Plantas testadas e número de amostra, massa do extrato obtido.

Nome da planta	Número da amostra	Peso do extracto (g)	DMSO (µl)
<i>Khaya senegalensis</i>	22	0.0405	810
<i>Abrus precatorius</i>	17	0,0165	330

### 3.3 Seleção dos moluscos, *Biomphalaria glabrata*

O ciclo de vida de *S. mansoni* (estirpe de Belo Horizonte-Brasil) é mantido no laboratório de Malacologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, (IHMT), tendo como hospedeiro intermediário, moluscos de água doce da espécie *Biomphalaria glabrata*, (estirpe de Belo Horizonte-Brasil) e como hospedeiro definitivo, a espécie *Mus musculus*.

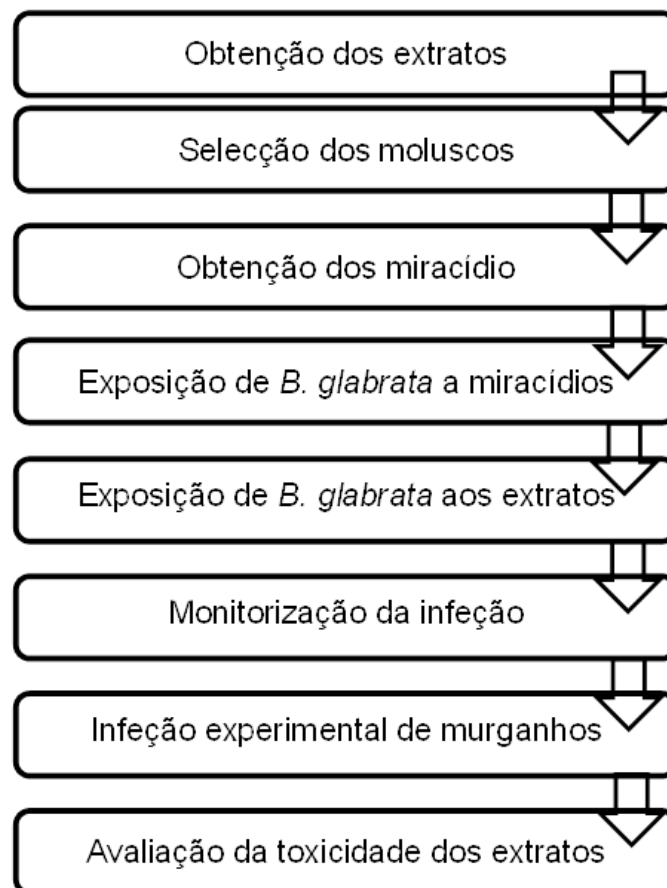
Foram selecionados moluscos com 8-12 milímetros de diâmetro, e divididos em grupos experimentais de acordo com desenho descrito na **Tabela 2** e metodologia abaixo descrita (**Figura 11**), num total de 378 moluscos. Foram também utilizados 48 moluscos como grupo controle. Cada grupo foi acondicionado em caixas de vidro com 300 ml de água desclorada e mantidos à temperatura ambiente de  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (**Figura 12**). Todas as semanas foi feita a mudança de água das caixas e os moluscos foram alimentados com alface fresca.

**Tabela 2** - Número total de moluscos (*B. glabrata*) para cada grupo experimental.

	Nº de moluscos expostos a <i>K.</i> <i>senegalensis</i>	Nº de moluscos expostos a <i>A.</i> <i>precatorius</i>	Nº de moluscos expostos a <b>DMSO</b>	Total
Nº de moluscos expostos <i>S.</i> <i>mansoni</i>	48	48	48	<b>144</b>
Nº de moluscos só expostos a <i>S.</i> <i>mansoni</i> *	42	42	42	<b>126</b>
Nº de moluscos só expostos aos extratos **	36	36	36	<b>108</b>
Total	<b>126</b>	<b>126</b>	<b>126</b>	<b>378</b>

\*- Grupos controle dos moluscos infectados

\*\* - Grupos controle dos moluscos expostos



**Figura 11** – Esquema sobre a metodologia experimental utilizada no ensaio.

### 3.4. Obtenção dos parasitas (*Schistosoma mansoni*)

#### 3.4.1 Obtenção de miracídios de *S. mansoni*

Para a obtenção de miracídios foi utilizado o protocolo da UEIPM/HMM adaptado de Duval & Dewitt (1967). Resumidamente, triturou-se o fígado de um murgancho (*Mus musculus*) infetado e com o auxílio de uma varinha mágica, este foi triturado em solução salina (1,75% NaCl), para a destruição dos tecidos hepáticos e se dar a libertação dos ovos. Filtrou-se a suspensão com duas espessuras de gaze e deixou-se repousar durante 20 minutos a 4°C. Fizeram-se várias lavagens e uma vez conseguida a transparência ideal, decantou-se a suspensão, guardando o sedimento. Filtrou-se novamente a suspensão com duas camadas de gaze, possibilitando assim a recolha de ovos do parasita. Para estimulação da eclosão dos miracídios adicionou-se um pouco de

água morna (27°C) e expôs-se à luz artificial com lâmpada de 70W, durante alguns minutos.

### 3.4.2 Exposição dos moluscos a miracídios de *S. mansoni*

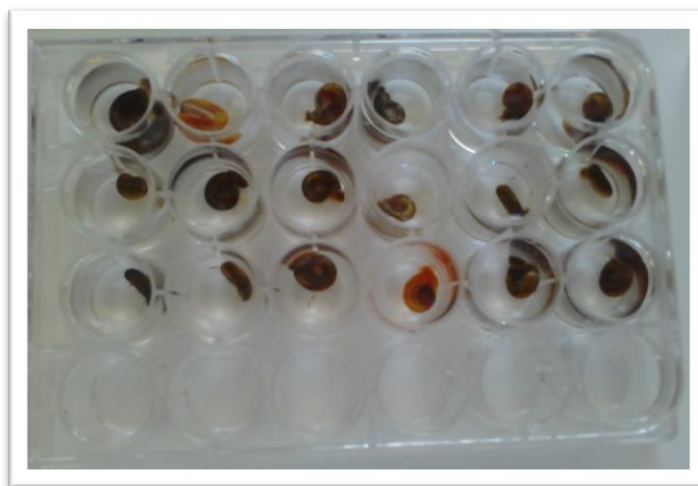
Os moluscos *B. glabrata* foram expostos individualmente a 10 miracídios em tubos de Willis com cerca de 5 ml de água, à temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ , durante a noite. Posteriormente foram colocados em caixas de vidro com 300 ml de água e mantidos à temperatura ambiente de  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (**Figura 12**), sendo alimentados com alface fresca duas vezes por semana.



**Figura 12** – Caixas onde foram mantidos os moluscos *B. glabrata* utilizados  
Original de Hélder Fernandes, 2014

### 3.5. Exposição dos moluscos aos extratos

Cinco dias após a exposição dos moluscos aos miracídios de *S. mansoni*, estes foram expostos a cada um dos extratos. Fizeram-se dois grupos controle, um exposto ao solvente DMSO e outro mantido em água e observados durante 24 horas (**Tabela 2**). Para o efeito, utilizaram-se placas de 24 poços onde os moluscos foram colocados individualmente com 2 ml de solução do extrato com uma concentração inicial de 500 ppm (**Figura 13**).



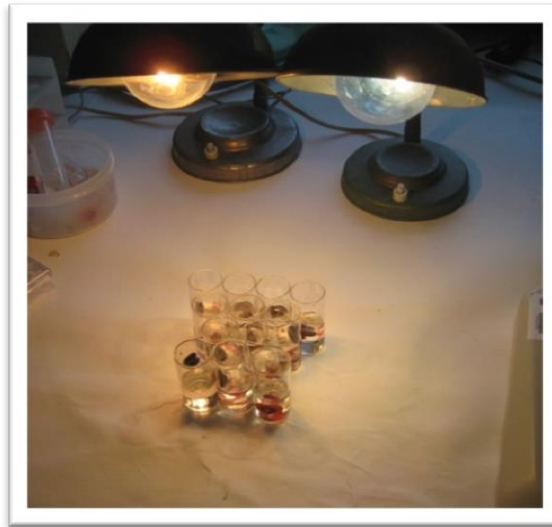
**Figura 13** – Placa com moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*.  
Original de Hélder Fernandes

Para cada extrato foram feitas três réplicas. Foi também feita uma réplica de moluscos controlo (não infetados nem expostos). Os moluscos estiveram expostos aos extratos 24 horas, durante as quais foi observada a sua sobrevivência. Ao fim desse tempo, os moluscos foram colocados em grupos de seis exemplares por caixas de vidro, por mais 72 horas. Durante este período foram observadas as reações comportamentais dos moluscos, tais como: alimentação, movimentação, posição da concha e mortalidade. Foram considerados mortos, os moluscos que não apresentaram batimentos cardíacos ao serem observados ao microscópio. Após 72 horas de observação os grupos foram mantidos no laboratório durante mais 16 semanas para monitorização da infeção com *S. mansoni*, mortalidade e o número de posturas produzidas.

### 3.5.1. Obtenção das cercárias

Para a obtenção de cercárias, os moluscos foram colocados individualmente em tubos de Willis com 10 ml de água e expostos à luz artificial de uma lâmpada de 70W (**Figura 14**) durante, pelo menos, uma hora e a presença de cercárias foi determinada por observação em estereoscópio. Para determinação da suscetibilidade este procedimento é iniciado 4 semanas após a exposição com miracídios de *S. mansoni* e monitorizado até 16 semanas após essa exposição.





**Figura 14** – Método para libertação de cercárias.  
Original de Hélder Fernandes, 2014

### **3.5.2. Monitorização da suscetibilidade dos moluscos à infeção**

Após 2 horas de exposição dos moluscos à luz artificial, inicia-se a contagem de cercárias. Para tal, retirou-se 0,5 ml da água para uma lâmina juntamente com 2 gotas de lixívia, de modo a imobilizar as cercárias. Ao microscópio, esta contagem é repetida 3 vezes para cada molusco e a partir da média destas contagens extrapolou-se para o volume de 10 ml. Foram feitas 2 contagens por semana para cada caixa e no final foi feita a média de cercárias eliminadas por semana para cada caixa.

## **3.6 Modelo Murino**

Foram utilizadas 10 fêmeas *Mus musculus* CD1 (**Figura 15**), com 8 semanas de idade, criadas no Biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.



**Figura 15** – Murganhos fêmea da espécie *Mus musculus*.  
Original de Hélder Fernandes, 2014

### 3.6.1 Infecção experimental

Na infecção experimental de *Mus musculus* com cercárias de *S. mansoni*, obtidas dos moluscos expostos aos extratos, foram utilizados dois lotes de murganhos, um para o extrato *K. senegalensis* e outro para *A. precatorius*. Para as cercárias obtidas pelos moluscos expostos a DMSO não foi possível proceder à infecção dos murganhos por falta de cercárias no período em que se procedeu à experiência.

Para cada um dos dois extratos foram utilizados cinco murganhos. As cercárias utilizadas para a infecção foram obtidas segundo o descrito no ponto 3.3 deste Capítulo. Cada um dos murganhos foi imobilizado numa caixa de madeira de modo a que a única zona exposta fosse a cauda, a qual foi imersa durante 2 horas num tubo de Willis com uma média de 100 cercárias em cada tubo. No final desse período os murganhos foram retirados das caixas de madeira, colocados nas suas caixas próprias, e mantidos no Biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Dois meses após a infecção estes foram sacrificados para verificação da presença de vermes adultos e ovos.

### 3.7. Avaliação de danos no DNA dos moluscos

Para determinar possíveis danos no DNA dos moluscos causados pela exposição aos extratos vegetais, foi utilizada a técnica de *Comet Assay*. A técnica foi adaptada do

protocolo de Azqueta *et al* (2013) e pode ser resumida nos passos que se seguem. Cobriram-se lâminas de microscópio com agarose a 1%, que foram mantidas à temperatura ambiente durante a noite. Extraíram-se 100 µl de hemolinfa de cada molusco com uma seringa de insulina, centrifugou-se durante 5 minutos a 2000 g e ressuspendeu-se em 50 µl de PBS (**Anexo 1**). No caso do controlo positivo ressuspendeu-se em 3 µl de água oxigenada juntamente com 60 µl de PBS. Posteriormente, dissolveu-se a hemolinfa em 300 µl de agarose *low-melting* a 1% previamente dissolvida em tampão PBS (**Anexo 1**) e distribui-se por uma lâmina de microscópio previamente preparada cobrindo-se com uma lamela. (24 \* 50 mm). As lâminas foram mantidas a 4°C até à solidificação da agarose. Após solidificação, removeram-se as lamelas e as lâminas foram colocadas em tampão de lise a 4°C. Após 24h, as lâminas foram retiradas do tampão de lise e colocadas numa tina de eletroforese contendo tampão alcalino de forma a ficarem totalmente cobertas.

A eletroforese iniciou-se 30 minutos após a imersão das lâminas. No final da eletroforese, as lâminas foram submersas em tampão PBS durante 10 minutos sendo de seguida submersas em água destilada.

Ao fim de 10 minutos estas foram colocadas à temperatura ambiente durante 24 horas, e posteriormente coradas com brometo de etídio (20µg/ml) e observadas em microscopia de fluorescência com filtros de 510 nm e 590 nm.

A avaliação foi feita visualmente de acordo com comprimento da cauda em cinco classes: 0 – sem dano aparente; 1 – dano reduzido; 2 – dano médio; 3 – dano elevado e 4 – dano máximo., completada com o tratamento estatístico.

### 3.8. Tratamento Estatístico

Para uma monitorização da eficácia dos extratos durante as 16 semanas de observação foi criada uma base de dados com o número de cercárias eliminadas por cada molusco, o número total de cercárias eliminadas por cada grupo, bem como a taxa de mortalidade e o número de posturas efetuadas.

Na análise de dados, foi utilizado o Programa SPSS versão 20. Depois de efetuar uma análise exploratória e descritiva das principais variáveis em estudo, verificou-se as condições de aplicabilidade de técnicas estatísticas paramétricas. Dado que os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias falharam frequentemente, optou-se por técnicas não paramétricas., nomeadamente, o teste Kruskal-Wallis, (Siegel & Catellan, 1988) , para comparar os valores médios dos parâmetros em estudo (número de sobreviventes, oviposição e número de cercárias eliminadas).

Para a visualização e contagem de cometas na técnica de *Comet Assay* foi utilizado o *software* CaspLab versão 1.2.3 beta 2. Os parâmetros utilizados foram a quantidade de DNA presente na cauda dos cometas e o seu comprimento, e com base na multiplicação destes dois parâmetros foi possível fazer a análise estatística. Os resultados obtidos para todos os tratamentos foram analisados, estatisticamente, pelo teste de ANOVA, com um intervalo de confiança de  $p < 0,05$ .

## **Capítulo IV – Resultados**

## 4. Resultados

### 4.1 Extratos utilizados

Os extratos vegetais utilizados foram obtidos a partir das folhas de *Abrus precatorius* e *Khaya senegalensis* e solubilizados em DMSO. No início do estudo foi feito um primeiro ensaio com uma concentração de 500 ppm. Não se verificou quaisquer alterações significativas durante as duas primeiras semanas de exposição aos extratos nos parâmetros de mortalidade e oviposição dos moluscos, pelo que a concentração dos extratos foi aumentada para 1000 ppm nos ensaios seguintes.

### 4.2 Sobrevivência e mortalidade de *B. glabrata*

Vinte e quatro horas após a exposição dos moluscos aos extratos, *K. senegalensis* e *A. precatorius* (1000 ppm), não se observaram quaisquer alterações na mortalidade (perda de batimentos cardíacos e movimentos, cuja observação foi feita com o apoio do microscópio estereoscópico). O mesmo se verificou nos grupos de moluscos expostos a DMSO (grupo de controlo, 1000 ppm) e ou a água (segundo grupo de controlo).

Durante as 16 semanas após a exposição aos extratos o grupo de *B. glabrata* infetado com *S. mansoni* e exposto a *Abrus precatorius* apresentou a maior taxa de mortalidade, 62,5% (n=30), seguido do grupo de moluscos infetados e expostos a *K. senegalensis* e do grupo de controlo (infetado e exposto a DMSO), ambos 60,4%. (n=29) (**Tabela 3**).

Para os grupos de moluscos expostos aos extratos mas não infetados, a taxa de mortalidade mais elevada foi observada nos expostos a *A. precatorius* 47,2% (n=17), seguido pelos expostos a *K. senegalensis* 41,7% (n=15) e pelo grupo controlo (DMSO) 38,9% (n=14). O maior número de moluscos sobreviventes foi observado no grupo controlo com moluscos não infetados e não expostos a nenhum extrato, com 27 moluscos e uma taxa de sobrevivência de 56,3% e de mortalidade 43,8% (**Tabela 3**).

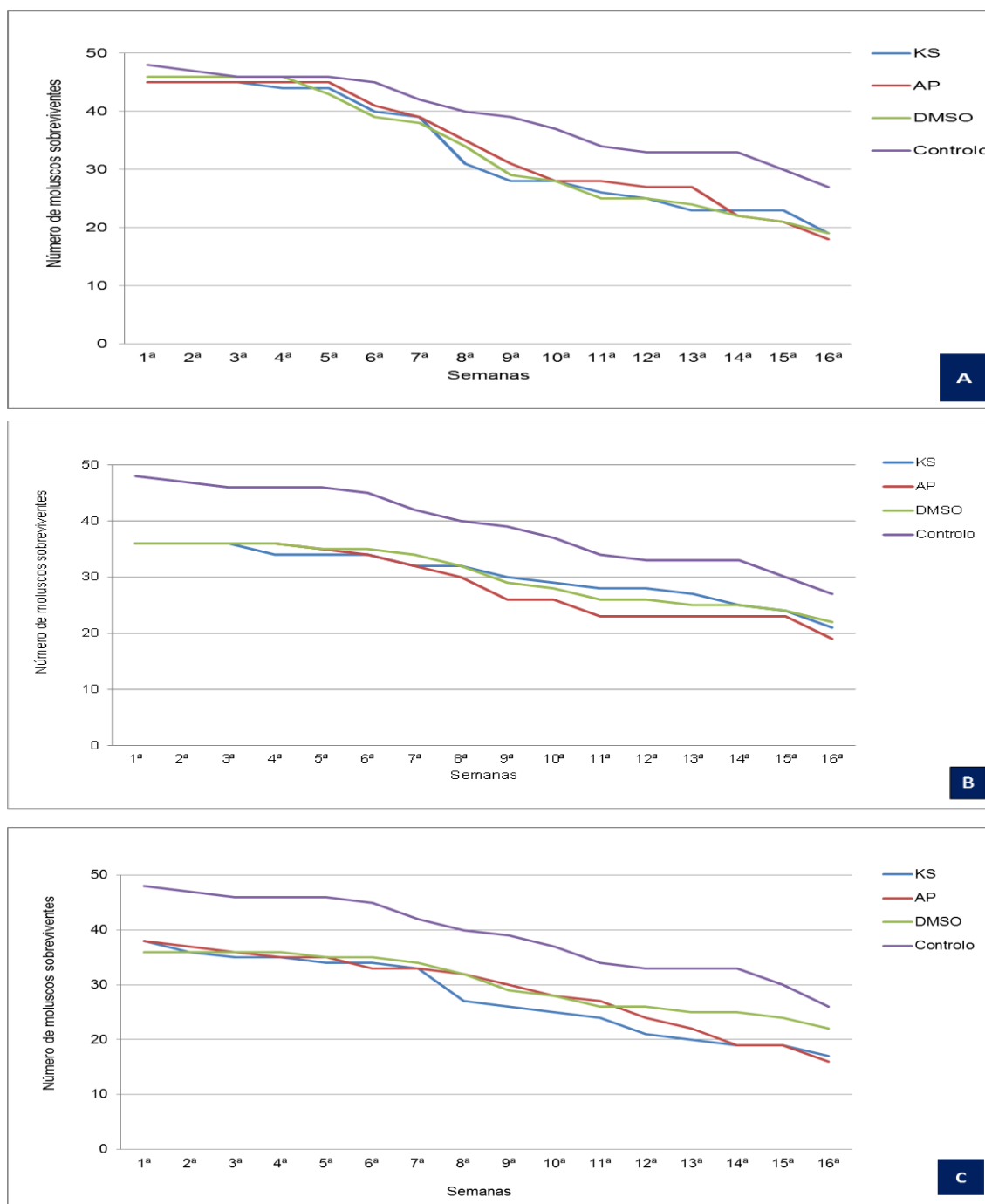
**Tabela 3** – Percentagem (%) do número total de moluscos sobreviventes e mortos por ensaio.

		<i>B. glabrata</i> infetada com <i>S.</i> <i>mansoni</i> e exposta aos extratos (n=48/extrato)	<i>B. glabrata</i> infetada com <i>S.</i> <i>mansoni</i> e não exposta aos extratos (n=42/extrato)	<i>B. glabrata</i> não infetada mas exposta aos extratos (n=36/extrato)	<i>B. glabrata</i> não infetada e não exposta (n=48)
<b><i>Khaya</i> <i>senegalensis</i></b>	Nº total de moluscos sobreviventes	<b>19</b> (39,6%)	<b>17</b> (40,5 %)	<b>21</b> (58,3%)	_____
	Nº total de moluscos mortos	<b>29</b> (60,4%)	<b>25</b> (59,5%)	<b>15</b> (41,7%)	
<b><i>Abrus</i> <i>precatorius</i></b>	Nº total de moluscos sobreviventes	<b>18</b> (37,5%)	<b>17</b> (40,5)	<b>19</b> (52,8 %)	_____
	Nº total de moluscos mortos	<b>30</b> (62,5%)	<b>25</b> (59,5%)	<b>17</b> (47,2%)	
<b>DMSO</b>	Nº total de moluscos sobreviventes	<b>19</b> (39,6%)	<b>22</b> (52,4%)	<b>22</b> (61,1%)	_____
	Nº total de moluscos mortos	<b>29</b> (60,4%)	<b>20</b> (47,6%)	<b>14</b> (38,9%)	
<b>Controlo</b>	Nº total de moluscos sobreviventes	_____	_____	_____	<b>27</b> (56,3%)
	Nº total de moluscos mortos				<b>21</b> (43,8%)

A **Figura 16** mostra a variação do número de moluscos sobreviventes ao longo das 16 semanas para os diferentes grupos de moluscos. Em todos eles se observa uma diminuição do número de moluscos, mas mais acentuada a partir da 8ª semana, em particular para o grupo dos moluscos infetados e expostos (**A**), e na 7ª semana para o grupo dos infetados e não expostos (**B**), enquanto para o grupo dos que foram apenas expostos a diminuição do número de moluscos mais acentuada tem início na 9ª semana (**C**). De registar que a taxa de sobrevivência para o grupo dos infetados e expostos foi muito semelhante ao grupo dos apenas infetados, com 39,6% e 40,5%, respetivamente.

A diferença entre a taxa de sobrevivência do grupo de moluscos infetados e exposto aos extratos e a taxa para o grupo de moluscos infetados e não expostos, foi estatisticamente significativa de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,001$ ). Não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo dos moluscos não infetados mas expostos aos extratos, para os quais se obtiveram os

seguintes valores:  $P=0,166$  para *K. senegalensis*,  $P=0,173$  para *A. precatorius* e  $P=0,131$  para DMSO.



**Figura 16** – Número de moluscos sobreviventes ao longo de 16 semanas.

**A-** *B. glabrata* infectada exposta ao extratos

**B-** *B. glabrata* apenas exposta aos extratos

**C-** *B. glabrata* apenas infetada



### 4.3 Oviposição (número de posturas)

Na Tabela 4, está registada a média total de posturas por molusco para cada grupo experimental. Comparando os grupos de moluscos infetados e expostos aos extratos, verifica-se que para os grupos expostos a *K. senegalensis* e *A. precatorius*, a média de posturas por molusco foi igual para ambos os grupos com 8 posturas por molusco. Por outro lado, o grupo de moluscos infetados mas não expostos a DMSO apresentou a média de posturas por molusco mais elevada (11 posturas).

**Tabela 4** – Média de posturas totais por molusco de cada grupo de ensaio durante as 16 semanas e respectivo desvio padrão.

		<i>B. glabrata</i> infetada com <i>S.</i> <i>mansoni</i> e exposta aos extratos	<i>B. glabrata</i> infetada com <i>S.</i> <i>mansoni</i> e não exposta aos extratos	<i>B. glabrata</i> não infetada mas exposta aos extratos	<i>B. glabrata</i> não infetada e não exposta
<i>Khaya</i> <i>senegalensis</i>	Média de posturas por molusco	8 ± 1,393	6 ± 0,680	4 ± 0,531	_____
<i>Abrus</i> <i>precatorius</i>	Média de posturas por molusco	8 ± 1,278	8 ± 0,883	5 ± 0,609	
DMSO	Média de posturas por molusco	6 ± 0,796	11 ± 0,796	6 ± 1,130	
Controlo	Média de posturas por molusco	_____			6 ± 0,704

Comparando a média de posturas por molusco de cada grupo experimental durante as 16 semanas (**Tabela 5**), verifica-se que os grupos de moluscos infetados e expostos ao extratos de *K. senegalensis* e de *A. precatorius* apresentaram uma média total de 67 posturas (14,0%) para ambos os grupos e 43 posturas (9,0%) para o grupo infetados exposto a DMSO.

Os grupos de moluscos não infetados mas expostos aos extratos apresentaram uma média total de apenas 94 posturas (19,7%), com 27 posturas (5,6%) para os expostos a *K. senegalensis*, 32 (6,7%) para *A. precatorius* e 35 (9,4%) para o DMSO (**Tabela 5**).

No total, a média de posturas mais elevada verificou-se no grupo dos moluscos infetados e expostos com 186 posturas (38,8%) enquanto os grupos dos moluscos

infetados mas não expostos, apresentaram uma média total de 154 posturas (32,2%) e o grupo controlo um total de 45 posturas (9,4%). (**Tabela 5**).

O início da oviposição, no grupo dos moluscos infetados e expostos a *K. senegalensis*, deu-se na 5ª semana, e no grupo exposto a *A. precatorius*, na 1ª semana. O grupo de moluscos infetado e exposto a DMSO iniciou a oviposição na 2ª semana atingindo uma média total de 52 posturas (10,9%), com dois picos na 14ª e 16ª semana, cada uma com 8 posturas por molusco (**Tabela 5; Figura 17**).

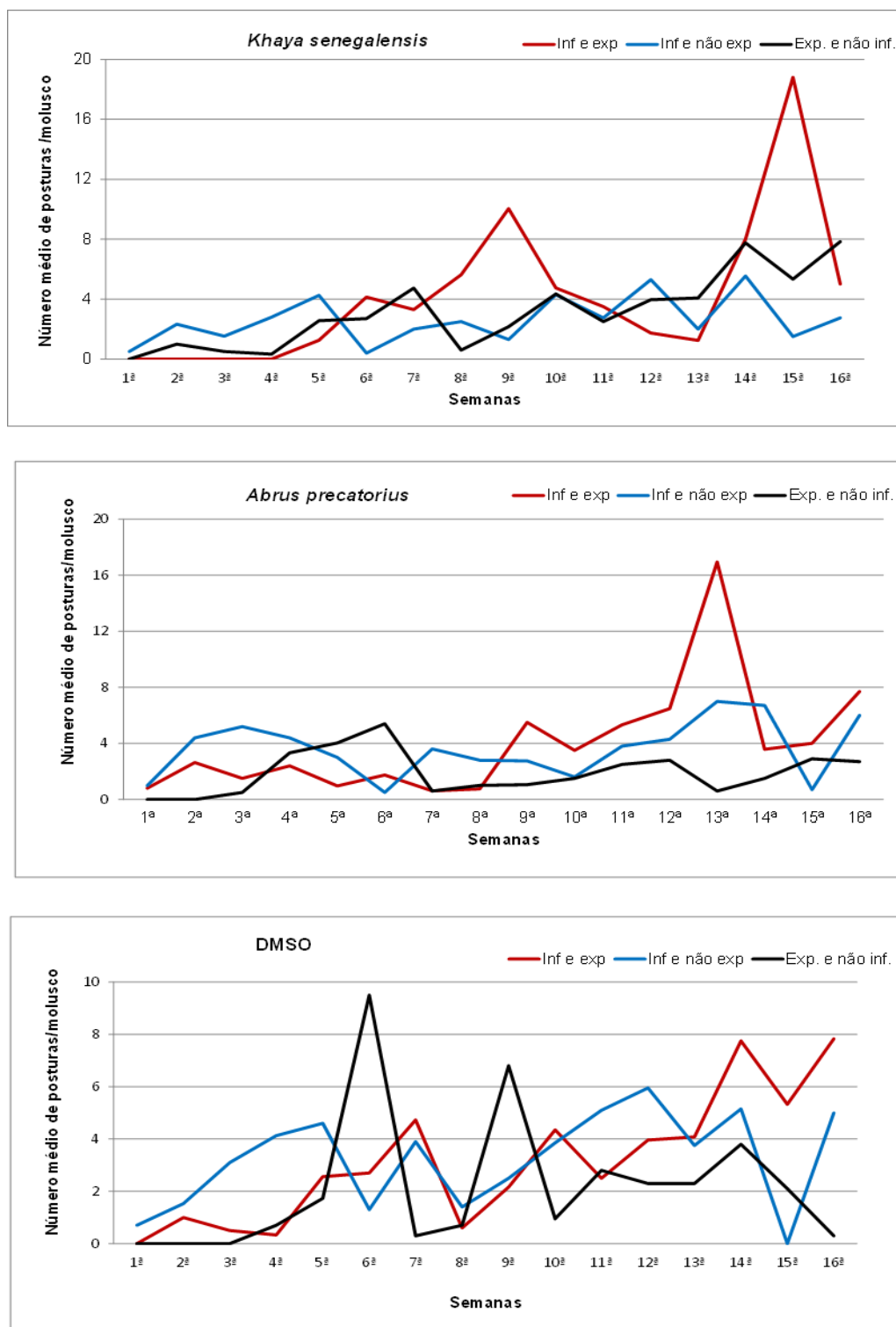
O grupo dos moluscos não infetados mas expostos, tanto para *K. senegalensis* como para *A. precatorius*, iniciaram a oviposição na 3ª semana, enquanto no grupo de expostos a DMSO a oviposição teve início na 4ª semana, apresentando dois picos na média de posturas, um pico na 6ª semana (10 posturas) e na 9ª semana (7 posturas) (**Tabela 5; Figura 17**).

Comparando o número de posturas para os três grupos de ensaio, observou-se que os dois grupos de moluscos expostos aos extratos iniciavam a oviposição mais tarde do que o grupo dos moluscos não exposto (**Tabela 5; Figura 17**).

Comparando a média total de posturas ao longo das 16 semanas, apenas se encontrou diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo dos moluscos infetados e expostos a *K. senegalensis* ( $P < 0,001$ ), enquanto que os restantes grupos não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

**Tabela 5** - Média de posturas produzidas por cada grupo experimental ao longo de 16 semanas.

		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª	13ª	14ª	15ª	16ª	Total	
<i>B. glabrata</i> infetada com <i>S. mansoni</i> i e exposta aos extratos	<i>K. senegalesis</i>	0	0	0	0	1	4	3	6	10	5	4	2	1	8	19	5	67 (14,0%)	186 (38,8%)
	<i>A. precatorius</i>	1	3	2	2	1	2	1	1	6	4	5	6	17	4	4	8	67 (14,0%)	
	DMSO	0	1	1	0	3	3	5	1	2	4	3	4	4	8	5	8	52 (10,9%)	
<i>B. glabrata</i> infetada com <i>S. mansoni</i> e não exposta aos extratos	<i>K. senegalesis</i>	1	2	2	3	4	0	2	3	1	4	3	5	2	6	2	3	43 (9,0%)	154 (32,2%)
	<i>A. precatorius</i>	1	4	5	4	3	1	4	3	3	2	4	4	7	7	1	6	58 (12,1%)	
	DMSO	1	2	3	4	5	1	4	1	3	4	5	6	4	5	0	5	53 (11,1%)	
<i>B. glabrata</i> não infetada mas exposta aos extratos	<i>K. senegalesis</i>	0	0	1	4	2	3	1	2	0	1	4	2	2	3	2	0	27 (5,6%)	94 (19,6%)
	<i>A. precatorius</i>	0	0	1	3	4	5	1	1	1	2	3	3	1	2	3	3	32 (6,7%)	
	DMSO	0	0	0	1	2	10	0	1	7	1	3	2	2	4	2	0	35 (7,3%)	
Controlo		0	0	4	8	8	4	3	1	1	2	6	4	0	2	2	1	45 (9,4%)	
Total		4 (0,8%)	12 (2,5%)	19 (4,0%)	29 (6,1%)	33 (6,9%)	33 (6,9%)	24 (5,0%)	20 (4,2%)	34 (7,0%)	27 (5,6%)	38 (7,9%)	38 (7,9%)	40 (8,4%)	49 (10,2%)	40 (8,4%)	39 (8,1%)	479	



**Figura 17** – Comparação do número médio de posturas por molusco para cada grupo de ensaio ao longo das 16 semanas.

#### 4.4 Avaliação do número de cercárias eliminadas

A capacidade de eliminação de cercárias pelos moluscos foi avaliada semanalmente, estabelecendo os dois período de infecção, o período pré-patente (período que se inicia após a exposição dos moluscos ao *S. mansoni* até ao início da eliminação de cercárias) e o período patente, período de eliminação de cercárias.

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 6**, observa-se que o período pré-patente foi em média de 5 semanas, com o início da libertação de cercárias na 6<sup>a</sup> semana (início do período patente). O grupo *B. glabrata* infetada e não exposta a *K. senegalensis* e DMSO (grupos controlo) apresentaram um período pré-patente de 6 (seis) semanas.

A média de cercárias eliminadas durante as 16 semanas, para o grupo de *B. glabrata* infetada e exposta a *K. senegalensis*, *A. precatorius* e DMSO foi de 7259 (22,0%), 5813 (17,6%) e 8219 (24,9%), respetivamente.

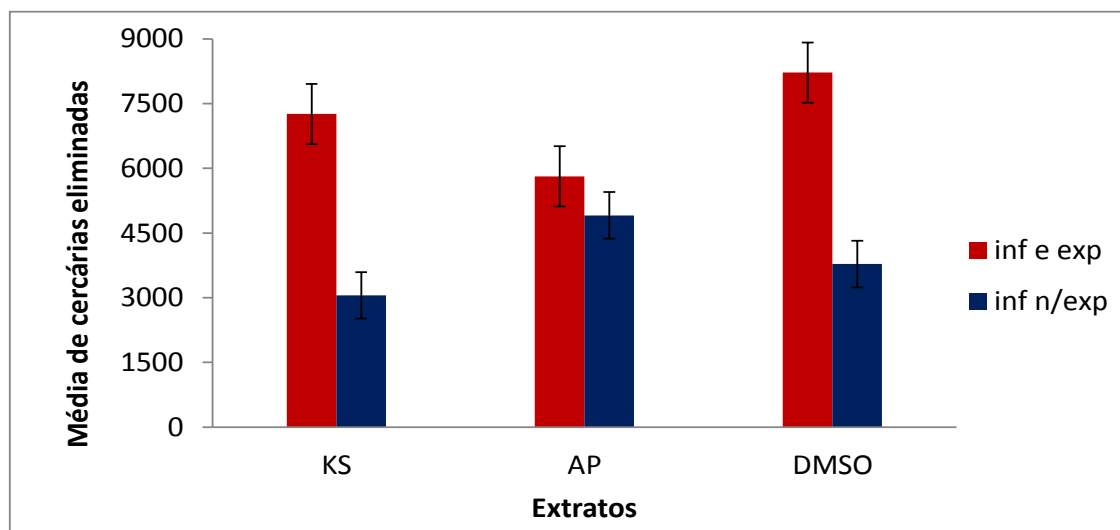
Para o conjunto dos dois ensaios, a média total de cercárias eliminadas em cada grupo foi de 21291 cercárias (64,5%) para os infetados e expostos e de 11738 (35,5%) apenas para o grupo infetados (grupo controlo) (**Tabela 6**).

O valor médio das cercárias eliminadas no grupo dos moluscos infetados e expostos foi superior para os três extratos relativamente ao grupo dos moluscos apenas infetados (**Figura 18**). O solvente DMSO foi o que apresentou o valor médio mais elevado, com 8219 (24,9%) cercária eliminadas.

## Resultados

**Tabela 6** - Média de cercárias eliminadas ao longo das 16 semanas pelos moluscos dos diferentes grupos experimentais.

		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª	13ª	14ª	15ª	16ª	Total	
<i>B. glabrata</i> infetada com <i>S. mansoni</i> e exposta aos extratos	<i>K. senegalesis</i>	0	0	0	0	0	376	362	629	499	504	862	716	847	772	852	841	7259 (22,0%)	21291 (64,5 %)
	<i>A. precatorius</i>	0	0	0	0	0	127	392	628	620	934	642	648	478	413	385	546	5813 (17,6%)	
	DMSO	0	0	0	0	0	348	980	901	777	801	699	664	901	764	775	610	8219 (24,9%)	
<i>B. glabrata</i> infetada com <i>S. mansoni</i> e não exposta aos extratos	<i>K. senegalesis</i>	0	0	0	0	0	0	153	259	368	290	257	276	558	537	353	0	3052 (9,2%)	11738 (35,5%)
	<i>A. precatorius</i>	0	0	0	0	0	142	148	617	595	405	1154	434	438	305	239	430	4907 (14,9%)	
	DMSO	0	0	0	0	0	0	348	571	638	362	264	234	504	501	336	21	3779 (11,4%)	
Total		0	0	0	0	0	993 (3,0%)	2384 (7,2%)	3604 (10,6%)	3497 (10,6%)	3296 (10,0%)	3878 (11,7%)	2971 (9,8%)	3726 (11,3%)	3291 (10,0%)	2940 (8,9%)	2449 (7,4%)	33029 (100%)	



**Figura 18** – Valor médio total de cercárias eliminadas durante as 16 semanas do ensaio.

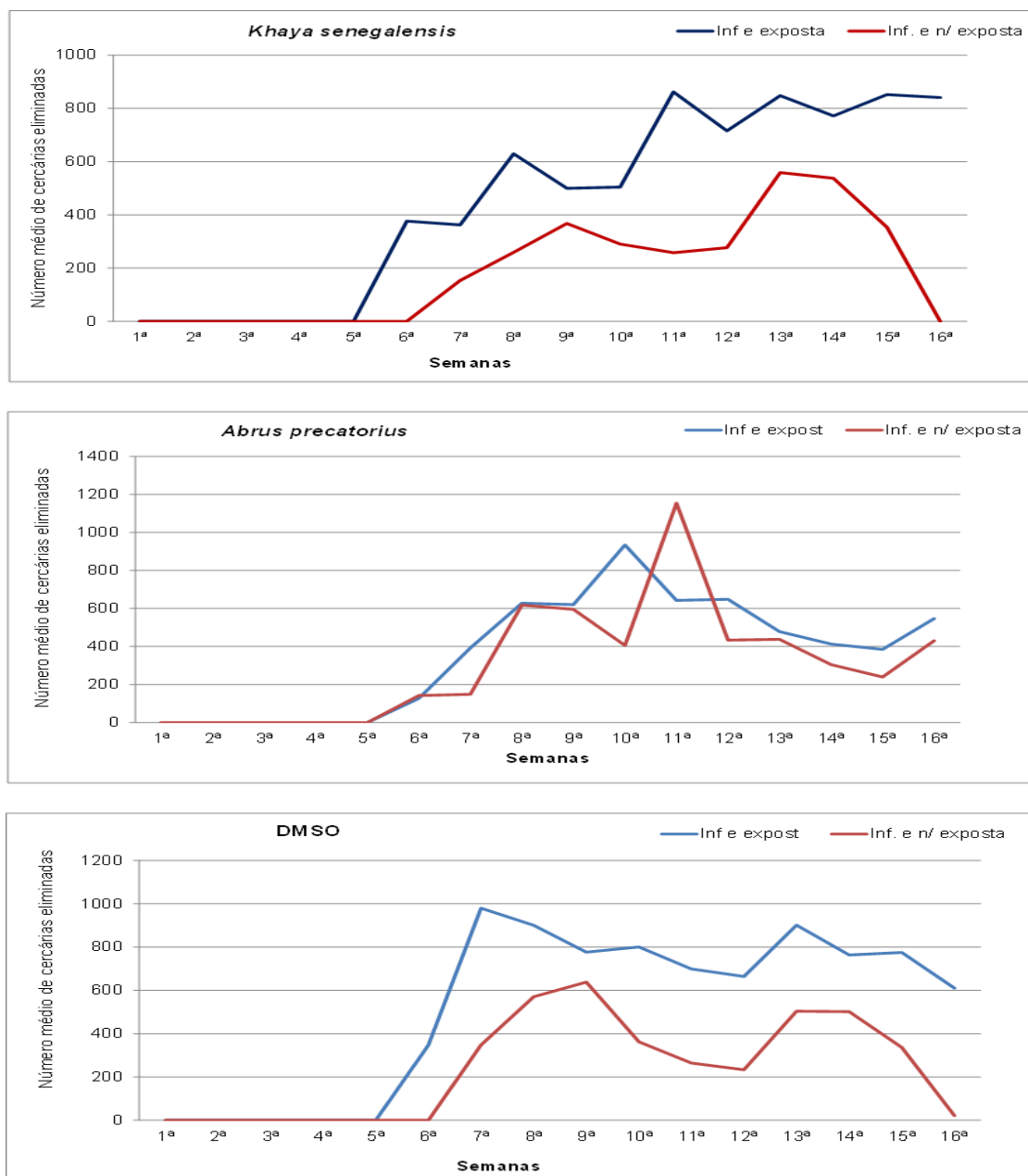
KS- *Khaya senegalensis*; AP – *Abrus precatorius*

A eliminação do maior número médio de cercárias ocorreu na 11ª semana (3878; 11,7%), com um decréscimo na 16ª semana (2449; 7,4%) (**Tabela 6**). Analisando a libertação de cercárias por grupo experimental, verifica-se que os moluscos infetados e expostos a *A. precatorius* apresentaram uma subida progressiva na libertação de cercárias a partir da 6ª semana (127 cercárias/molusco), atingindo o seu máximo na 10ª semana (934 cercárias/molusco), a partir da qual, se iniciou uma quebra gradual que vai até ao final do estudo. Para os moluscos infetados e expostos a *K. senegalensis*, a libertação de cercárias é mais constante, embora haja também uma subida progressiva até atingir o valor máximo na 11ª semana (862 cercárias/molusco) (**Tabela 6, Figura 19**). Nas semanas seguintes, o número médio de cercárias eliminadas manteve-se entre as 700 e as 800. No grupo dos infetados e expostos a DMSO, o valor máximo de cercárias eliminadas ocorreu na 7ª semana (980 cercárias), a partir da qual deu-se uma diminuição desse valor, voltando novamente a subir na 13ª semana (901 cercárias). Até ao final do estudo a descida do valor médio de cercárias eliminadas foi gradual. (**Tabela 6; Figura 19**).

No grupo de *B. glabrata* apenas infetada com *S. mansoni*, grupo controlo de *A. precatorius* foi o que apresentou o valor médio mais elevado, com 1154 cercárias eliminadas. Em comparação, o valor médio de cercárias eliminadas foi mais baixo para

os restantes grupos controlo, *K. senegalensis* e DMSO, com 257 e 264 cercárias, respetivamente (**Tabela 6; Figura 19**).

Na comparação do número médio de cercárias eliminadas por grupo de moluscos nos diferentes ensaios e ao longo das 16 semanas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis cujos resultados apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $P<0,001$ ) para cada um deles.



**Figura 19** – Comparação da média de cercárias eliminadas por extrato e grupos experimentais durante as 16 semanas





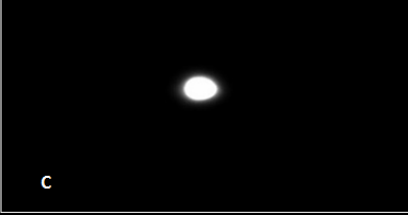
## 4.5 Determinação de danos no DNA de *B. glabrata*

### 4.5.1 Avaliação do Teste Cometa





Utilizando a técnica de *Comet Assay* (teste cometa) foi possível medir os danos no DNA dos moluscos para cada grupo experimental. Em indivíduos de *B. glabrata* não infetados mas expostos aos diferentes extratos, verificou-se que a média de dano foi mais elevado no grupo exposto ao extrato *K. senegalensis*(**A**), 44,91 (máximo=1972,60), enquanto a média apresentada pelo grupo exposto a *A. precatorius* (**B**) e grupo controlo negativo (**C**) foi de 39,91 (máximo=574,60) e 62,40 (máximo=1037,40), respetivamente (**Tabela 7**).

Devido à degradação total das amostras do grupo apenas exposto ao DMSO não foi possível apresentar os seus resultados.

**Tabela 7-** Médias descritivas dos danos no DNA encontrado nos moluscos da espécie *B. glabrata* não infetados com *Schistosoma mansoni* e expostos aos diferentes extratos.

Grupo	Número de amostras	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Imagem
<i>B. glabrata</i> exposta ao extrato de <i>Khaya senegalensis</i>	99	44,91	211,57	0	1972,60	 A
<i>B. glabrata</i> exposta ao extrato de <i>Abrus precatorius</i>	99	39,01	94,51	0	574,60	 B
<i>B. glabrata</i> (controlo negativo)	99	62,40	163,98	0	1037,40	 C

**Tabela 8** - Comparação dos danos de DNA obtidos pelo teste cometa para os grupos de *B. glabrata* infectados e expostos aos diferentes extratos.

Grupo	Número de amostras	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Imagem
<i>B. glabrata</i> infectada com <i>Schistosoma mansoni</i> e expostos ao extrato de <i>Khaya senegalensis</i>	99	129,67	308,94	0	2154,30	
<i>B. glabrata</i> infectada com <i>Schistosoma mansoni</i> e expostos ao extrato de <i>Abrus precatorius</i>	99	114,99	234,43	0	1853,90	
<i>B. glabrata</i> infectada com <i>Schistosoma mansoni</i> e expostos a DMSO	99	173,33	370,81	0	3059,20	
<i>B. glabrata</i> (controle positivo)	99	1599,21	2896,43	0	16892,60	

Para os grupos de *B. glabrata* infectados com *S. mansoni*, a média mais elevada para o dano de DNA foi observada no grupo exposto a DMSO (**F**) com 173,33 (máximo=3059,20), mas não muito superior ao grupo exposto a *K. senegalensis* (**D**), 129,67 (máximo=2154,30) e pelo grupo exposto a *A. precatorius* (**E**) foi 114,99 (máximo=1853,90). A média de dano apresentado pelo grupo controle positivo (**G**) foi de 1599,21 (Máximo=16892,60) (**Tabela 8**).

Como se vê nas imagens apresentadas na Tabela 8, os danos no DNA por célula foram muito baixos (todos eles incluídos na classe 1).

A fim de complementar o estudo das médias descritivas de dano de DNA nos moluscos dos diferentes grupos experimentais foi aplicado o teste estatístico de ANOVA.

A avaliação pelo *Comet Assay* (teste do cometa) sobre os efeitos genotóxicos na *Biomphalaria glabrata* quando exposta aos diferentes extratos, mostrou resultados estatisticamente significativos para os grupos infetados e expostos a *K. senegalensis* ( $P < 0.05$ ). Porém, os resultados apresentados pelo grupo dos infetados e exposto a *A. precatorius* e *DMSO* quando comparados entre si, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $P = 1,00$ ).

Por outro lado, quando comparando o nível de dano dos grupos de moluscos apenas expostos aos extratos, os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos, *K. senegalensis* apresentou o valor de  $P = 1,00$ , *A. precatorius* o valor de  $P = 0,998$  e *DMSO* o valor de  $P = 0,172$ .

#### **4.6 Infecção experimental de *Mus musculus* com cercárias de *S. mansoni***

Dois meses após a exposição dos murganhos *M. musculus* a cercárias de *S. mansoni* libertadas pelos caracóis expostos aos extratos em estudo, estes foram sacrificados e obtidos os vermes pela técnica de perfusão. Dos murganhos infetados com cercárias obtidas dos moluscos expostos a *A. precatorius* obtiveram-se 45 vermes adultos (21 fêmeas e 24 machos). Dos murganhos infetados com cercárias obtidas dos moluscos expostos a *K. senegalensis* obteve-se um maior número total de vermes adultos, mas apenas machos ( $n = 78$ ). Com os miracídios obtidos dos ovos dos vermes adultos, resultantes dos murganhos infetados com as cercárias expostas a *A. precatorius*, foi exposto um lote de moluscos ( $n = 25$ ). Cinco meses após a exposição não foi possível observar a eliminação de cercárias, provavelmente devido a alterações da infecciosidade do miracídio.

## **Capítulo V – Discussão**

## 5. Discussão

Moluscos da espécie *B. glabrata* desempenham um importante papel na transmissão da schistosomose, uma vez que são hospedeiros intermediários de *S. mansoni*.

Embora o número estimado de pessoas infetadas por *Schistosoma* spp não se tenha alterado significativamente nas últimas décadas, observa-se uma alteração na sua distribuição (Engels *et al*, 2002), devido a medidas de controlo implementadas em algumas regiões afetadas, sendo que uma das medidas de maior sucesso é a aplicação de moluscidas (Webbe & El Hak, 1990, Silva *et al*, 2008).

A niclosamida é o moluscida recomendado pela OMS, já que demonstrou ser mais eficaz que outros moluscidas orgânicos ou até sintéticos. Porém devido à sua acção tóxica na maioria dos casos com prejuízos para o meio ambiente sobretudo na fauna e flora aquáticas, associada ao elevado custo da sua aplicação, fazem com que seja necessário um maior investimento em estudos que encontrem uma nova alternativa que seja bem sucedida no controlo dos moluscos, hospedeiros intermediários (Perret & Whitfield, 1996; Singh *et al*, 2009; Rocha, *et al*, 2013).

Desta forma, devido à necessidade de se encontrar moluscidas mais eficazes e mais ecológicas, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos, nomeadamente na pesquisa de moluscidas de origem vegetal ou até de compostos inibitórios da maturação dos miracidios (McCullough *et al*, 1980; Souza, 1995, Mendes *et al*, 1984; Teles *et al*, 2010), uma vez que estes apresentam atividade tóxica para os moluscos, devido à presenças de metabolitos secundários, tais como, taninos e saponinas (Chifundera *et al*, 1993; Singh *et al*, 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (1993) para uma planta apresentar atividade moluscida deve provocar 90 % de mortalidade dos moluscos nas primeiras 24 horas de exposição.

Face ao acima descrito, o presente estudo apresenta os primeiros resultados, ainda que preliminares, da ação dos extratos de folhas de *A. precatorius* (Fabaceae) e *K. senegalensis* (Meliaceae) em *B. glabrata* infetada e não infetada com *S. mansoni*. De acordo com os parâmetros estabelecidos pela OMS, nenhum dos extratos aqui testados apresentou ação moluscida, apesar de se ter verificado uma taxa de mortalidade mais

elevada no grupo dos moluscos infetados e exposto a *A. precatorius* (62,5% comparada com a do extrato *K. senegalensis* (60,4%) ao longo das 16 semanas.

Diversos estudos foram já descritos sobre a atividade destes dois extratos como antihelmínticos (Ndamba *et al*, 1994; Mølgaard *et al*, 2001, Koné, *et al*, 2012), contudo só *A. precatorius* foi utilizado como moluscicida, mas não em moluscos do género *Biomphalaria*.

Em 1998, no trabalho realizado por Singh & Singh, aplicado no controlo de *Lymnaea acuminata* (hospedeiro intermediário de *F. hepatica* e *F. gigantica* na Índia), verificou-se que *A. precatorius* poderia ser um potencial moluscicida devido à sua acção tóxica, em que as partes ativas da planta, responsáveis pela atividade moluscicida são a abrina e a glicirrizina, presentes nas sementes e raiz desta planta devido à sua acção tóxica. Por outro lado, um outro estudo utilizando extratos de *A. precatorius* obtido do caule e folhas, não apresentaram qualquer bioatividade quando aplicados em cestodes. (Mølgaard *et al*, 2001). Ainda no mesmo estudo, demonstrou-se ainda que os extratos de *A. precatorius* obtidos das sementes e raízes, poderão ser usados no tratamento da schistosomose, ao serem testados com sucesso, nas formas larvares do *S. mansoni*.

Um outro estudo realizado por Koné *et al* (2012), mostrou a eficácia que os extratos de *K. senegalensis* obtidos da casca do caule como antihelmíntico, nomeadamente, em tremátodes. Considerando que as folhas não apresentam as substâncias ativas presentes nas outras partes, poderá ser uma explicação para estes dois extratos não apresentarem atividade moluscicida.

Outro aspecto a considerar neste estudo foi a atividade reprodutiva dos moluscos que não foi afetada pela exposição destes aos extratos tendo-se verificado que o grupo dos moluscos infetados e expostos (aos dois extratos e ao solvente DMSO), apresentaram um de 186 (38,8%) posturas, quando comparada com o grupo dos moluscos só infetados (154:32,2%) e o grupo dos moluscos só expostos (94:19,6%).

Embora tenham existido estas diferenças no número médio de posturas produzidas entre os vários grupos experimentais segundo o teste Kruskal-Wallis estas só foram significativas no grupo de moluscos infetados e expostos ao extrato de *Khaya senegalensis* e no grupo de moluscos infetados mas não expostos a nenhum extrato (neste caso no controlo para os moluscos expostos ao extrato de *Khaya senegalensis*).

Nos estudos realizados por Barbosa (1960), e Bezerra & Becker (1993), verificou-se que o molusco *B. glabrata* quando ameaçado ou colocado em situação de *stress*, apresenta um aumento na taxa de oviposição de modo a garantir a sobrevivência da espécie. Assim, a exposição ao extrato *K. senegalensis*, associada à infecção poderia ter provocado um ambiente desfavorável aos moluscos, que não sendo o suficiente para induzir a morte, mas para induzir alterações fisiológicas.

Também autores como Coelho (1954) e Lewis *et al* (1996), fazem referência aos efeitos da infecção sobre a reprodução dos moluscos ao verificarem que em *B. glabrata* quando infetada com *S.mansoni* mostrava uma redução drástica na produção de posturas, considerando aqueles autores que a infecção tem um efeito castrador nos moluscos. Este efeito só é observado nos moluscos só infetados.

Entre as condições consideradas como importantes para a determinação da “qualidade” de hospedeiro intermediário de *S.mansoni*, estão a quantidade de cercárias eliminadas e a longevidade dos moluscos infetados (Barbosa & Coelho, 1954). É evidente que moluscos que eliminam maior quantidade de cercárias e que apresentam um mais longo período de sobrevivência, em condições experimentais, são hospedeiros potencialmente importantes. Os resultados obtidos neste estudo parecem confirmar que *B. glabrata* apresenta-se como uma espécie importante no ciclo de vida de *S. mansoni* devido à suscetibilidade observada apesar da exposição destes, a diferentes tipos de extrato.

Com base nos resultados da **Tabela 6** e **Figura 19**, verifica-se duração do período pré-patente foi de cinco semanas nos moluscos infetados e expostos aos extratos. No grupo de moluscos infetado mas não exposto (grupo controlo), o período pré-patente foi de 6 semanas (controlo para *A. precatorius* e DMSO).

Quanto à comparação da suscetibilidade eliminação de cercárias nos moluscos dos diferentes grupos de ensaio, os resultados obtidos mostram que os moluscos infetados e expostos eliminaram um maior número de cercárias (21291: 64,5%) relativamente ao grupo só dos infetados (17259: 35,9%). Estes resultados parecem estar em contradição com os resultados obtidos por Zanbagi *et al* (2005), em que o número de cercárias eliminadas por *B. alexandria* quando exposta ao extrato metanólico derivado de *Euphorbia schimperiana* eliminava um número significativo menor de cercárias do que

os moluscos não expostos. Estes dados também estão de acordo com os obtidos por Ahmed & Ramzy (1997) ou ainda por Gamalat (2014), Fayez (2009) e Sharaf (2001).

Uma razão para justificar os nossos resultados, poderá estar relacionada com a espécie de planta e concentração utilizada no ensaio, considerando que as espécies utilizadas por estes dois autores foram *E. schimperiana* e *Solanum nigrum*, entre outras.

É também de referir que os moluscos infetados e expostos a DMSO (o nosso solvente, controlo positivo) foram os que produziram um maior número de cercárias entre todos os grupos experimentais, o que levanta a questão se este efeito indutor na libertação de cercárias não será sim devido ao solvente constituinte dos extratos e não á natureza do extrato das plantas em si. Na literatura não foram encontrados mais casos descritos em que fosse utilizado o DMSO como controlo na libertação de cercárias por parte de moluscos. O que é descrito nos estudos de Silva (2006) e Medina (2009) é que o DMSO não provoca um aumento da mortalidade dos moluscos quando utilizado em baixas concentrações o que é também verificado no presente estudo.

Quanto á comparação entre o número de moluscos sobreviventes, posturas produzidas e o número de cercárias eliminadas, verificou-se que o grupo de moluscos só infetado apresentou o mesmo número de moluscos sobreviventes que o grupo de moluscos expostos e infetados. Porém, no que respeita quer ao número de posturas produzidas, quer ao número de cercárias eliminadas os resultados obtidos foram inferiores ao grupo dos infetados e expostos.

Quanto aos efeitos da infeção sobre a reprodução dos moluscos autores como Coelho (1954) e Lewis *et al.* (1996), verificaram que em *B. glabrata* quando infetada com *S. mansoni* mostrava uma redução drástica na produção de posturas, considerando aqueles autores que a infeção tem um efeito castrador nos moluscos. Este efeito só é observado nos moluscos só infetados. Neste caso, a exposição aos extratos e a infeção por *S. mansoni*, parecem acelerar o processo multiplicação que induziu a libertação de um maior número de cercárias e a produção de um maior número de posturas.

Relativamente à infeção experimental dos murganhos com cercárias provenientes dos moluscos expostos ao extratos testados, foi possível verificar que nos murganhos infetados com cercárias provenientes de moluscos expostos ao extrato de *Khaya senegalensis* não foram encontrados vermes adultos fêmeas, apenas machos. Devido ao baixo número de murganhos (5) utilizados não foi possível concluir se este resultado



deveu-se à ação dos extratos ou se foi um mero acaso. Nos murganhos infetados com cercárias provenientes de moluscos expostos ao extrato de *Abrus precatorius* foram obtidos vermes adultos macho e fêmea e os respectivos ovos. Depois da eclosão dos mesmos os miracídios foram utilizados na infecção de *B. glabrata*, os quais não libertaram nenhuma cercária durante o tempo em que decorreu o presente estudo (aproximadamente cinco meses), verificando-se um período pré patente bastante maior que o habitual.

Apesar de os dois extratos não terem demonstrado atividade moluscicida, com a aplicação da técnica de *Comet Assay* foi possível medir o dano no DNA dos moluscos expostos, os quais apresentaram um dano pouco expressivo (**Tabela 7**).

Tendo em conta que os grupos que foram só expostos aos extratos não revelaram quaisquer danos significativos é sugerido que os extratos em si não são causadores de um dano significativo no DNA de *B. glabrata* mas que a infecção ou associação das duas vertentes (exposição ao extrato de *Abrus precatorius* ou a DMSO e infecção com *S. mansoni*) poderá realmente induzir um dano significativo no DNA destes moluscos. Esta situação já foi verificada em outros estudos como no de Mohamed (2011) no qual ao demonstrar a genotoxicidade do herbicida Roundup para com os moluscos da espécie *Biomphalaria alexandrina* verificou que o grupo exposto e infetado com *S. mansoni* apresentava mais dano no DNA do que o grupo de moluscos só exposto ao herbicida em questão. Tanto o estudo anterior como o de Grazeffe e colaboradores (2008), em que através da técnica de *Comet Assay* analisaram os efeitos mutagénicos de compostos poluentes do meio aquático em moluscos da espécie *B. glabrata*, bem como tantos outros estudos demonstram a eficácia desta técnica.

Os resultados apresentados neste trabalho, apesar de deixarem em aberto muitas questões, possibilitam e sustentam estudos futuros mais aprofundados com as espécies de plantas aqui descritas.

## **Capítulo VI – Conclusão**

## 6. Conclusão

Este trabalho procurou identificar extratos de espécies de plantas oriundos da Guiné-Bissau promissores no controlo da schistosomose por *S. mansoni*.

Embora os resultados sejam bastante preliminares, pode-se concluir que;

- a) Os dois extratos utilizados apesar de não terem revelado um efeito moluscicida, poderão ser utilizados no controlo desta parasitose;
- b) A taxa de mortalidade foi maior nos moluscos infetados e expostos a *A. precatorius*.
- c) A associação entre a infeção e a exposição aos extratos induz a libertação do maior número de cercárias;
- d) O número de cercárias eliminadas mostrou ser estatisticamente significativo no grupo dos infetados e expostos para os três ensaios;
- e) Os extratos parecem afetar a viabilidade das formas infetantes, quer para o hospedeiro definitivo (cercárias), quer para o hospedeiro intermediário (miracídeos).
- f) A técnica de *Comet Assay* demonstrou ser uma técnica eficaz na avaliação do dano no DNA,

Futuramente, deverão ser aprofundados conhecimentos sobre estas plantas, utilizando outras metodologias e planos experimentais, mas também recorrendo aos métodos já utilizados no presente estudo de modo a testar novas concentrações dos extratos destas plantas e diferentes tempos de exposição dos mesmos aos moluscos.

Também poderiam ser feitas novas abordagens no próprio processo de produção dos extratos, tais como, como a utilização de outro tipo de material vegetal, outro tipo de solvente para além do DMSO, bem como novos extratos provenientes de outras espécies plantas. Uma amostragem maior de murganhos seria também uma boa forma de poder clarificar os resultados preliminares obtidos, de modo a compreender se os extratos têm algum efeito nos vermes adultos de *S. mansoni*.

## **Capítulo VII – Referências Bibliográficas**

## 7. Referências Bibliográficas

- Adebayo, J. O., Yakubu, M. T., Egwim, E. C., Owoyele, V. B., & Enaibe, B. U. 2003. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. *Journal of Ethnopharmacology*, **88** (1): 69-72.
- African Plantas – *Abrus precatorius* [Online]. Disponível em: [http://www.westafricanplants.senckenberg.de/images/pictures/abrus\\_precatorius\\_at\\_img\\_1477\\_15\\_3b7dc3.jpg](http://www.westafricanplants.senckenberg.de/images/pictures/abrus_precatorius_at_img_1477_15_3b7dc3.jpg). Acedido a 18 de Junho de 2014.
- African Plantas – *Khaya senegalensis* [Online]. Disponível em: [http://www.westafricanplants.senckenberg.de/images/pictures/khaya\\_senegalensis-allee,\\_sya,\\_nahe\\_nazinga\\_stpo\\_951\\_dafa51.jpg](http://www.westafricanplants.senckenberg.de/images/pictures/khaya_senegalensis-allee,_sya,_nahe_nazinga_stpo_951_dafa51.jpg). Acedido a 18 de Junho de 2014.
- Ahmed, A. H. & Ramzy, R. M. R. 1997. Laboratory assessment of the cercaricidal activities of the Egyptian weeds *Solanum nigrum* L Molliscicidal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**: 931-938.
- Al-Zanbagi, N. A. & Abuljadayel, D.A. 2005. Attenuation of *Schistosoma mansoni* larvae with a molluscicide derived from *Euphorbia Schimperiana*. *The Scientific Journal of Al-Azhan Medical Faculty*, **26**(1):1513 – 1524.
- Asfora , J., & Domingues, A. L. 1975. Evolução terapêutica da *esquistossomose mansoni*. *Anais- Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, Páginas 291- 300.
- Azevedo, F. F., Xavier, M.L.S., Santos, M. A. M. & Avelino, I. C. 1969. O significado do estudo no laboratório de *Schistosoma heamatobium*. *Jornal Sociedade Ciências Médicas. Lisboa*, **133** (8): 607-622.
- Azevedo, J. F., Silva, J. B., Coito, A. M., Coelho, M. F. & Colaço, A. 1948. “O foco português de schistosomiasis”. *Anais- Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, **5**: 175- 222.

- Azqueta, A. and Collins, A. R. 2011. The Comet Assay: A Sensitive and Quantitative Method for Analysis of DNA Damage. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.
- Baker, F. C. 1945. *The Molluscan Family Planorbidae*. Univ. Illinois Press . Urbana, Illinois.
- Bakry, F. A. 2009. Use of some plant extracts to control *Biomphalaria alexandrina* snails with emphasis on some biological effects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **95** (3), 159-165.
- Barbosa, C.S & Barbosa, F.S. 1995. Controle biológico dos moluscos transmissores da esquistossomose: A competição interespecífica *Biomphalaria glabrata* X *Biomphalaria straminea*. In: Barbosa, F.S. (Org.). *Tópicos em Malacologia Médica*. Rio de Janeiro, Fiocruz, 221-238.
- Barbosa, F. S. 1960. Alguns aspetos das relações hospedeiro-parasito entre as fases larvares do trematódeo *Schistosoma mansoni* e o molusco *Australobis glabratus* . *Boletim Fundação Gonçalo Muniz*, **15**: 1- 44.
- Barbosa, F. S. 1995. *Tópicos em malacologia médica*. Editora Fiocruz, Páginas 80-84, 96-98, 115 – 154.
- Bergquist, N. R. 2002. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends Parasitology*, **18**: 309 – 314.
- Bettencourt, A., & Borges, I. 1922. *Relatório da missão do Instituto Câmara Pestana para o estudo da bilharzíase em Portugal*: Imprensa Nacional.

- Bezerra, J. C. B., Becker, W. 1993. Konzentrtion organischer Sauren in der Hamolymphe von *Biomphalaria glabrata* unter verschiedenem physiologischen zustanden. *Verb Dtsch Zool Ges*, **86**: 1-81.
- Bezerra, J. C., Ferreira, H.D., Ferri, P.H., Santos, S.C., Silva, I. A. 2002. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Revista Fitoterapia*, **73**: 428-430 .
- Bhatia M, Siddiqui NA & Gupta S.2013. *Abrus precatorius* (L.): An evaluation of traditional herb. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, **3** (4): 3295-3315.
- Bowles, J. & McManus, D. P.1993. “Molecular variation in *Echinococcus*,” *Acta Tropica*, **53** (3-4): 291– 305.
- Brumpt, E. 1941. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis* (*Australorbis glabratus*) hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, **18** (1): 9-45.
- Burkill,H.M.1997.The Useful Plants of West Tropical Africa: Royal Botanic Gardens,**4**, 956-969.
- CABI - Distribuição global de *Biomphalaria glabrata*. [Online]. Disponível em: [http://www.cabi.org/5\\_91389\\_world\\_normal.distmap](http://www.cabi.org/5_91389_world_normal.distmap). Acedido a 8 de Junho de 2014.
- Carvalho, O.S., Nunes, I.M., Caldeira, R.L.1998.First report of *Biomphalaria glabrata* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, **39** (1): 39-40.

- Carvalho, O. S., Caldeira, R. L., Simpson, A.J.G. & Vidigal, T.H.D.A.2001. Genetic variability and molecular identification of brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca:Planorbidae). *Parasitology*, **123**: 197-207.
- Centro de Controlo e Prevenção de Doença (C.D.C.) – Ciclo de vida de *Schistosoma mansoni* [Online]. Disponível em: [http://www.cdc.gov/parasites/images/shistosomiasis/schistomes\\_lifecycle.gif](http://www.cdc.gov/parasites/images/shistosomiasis/schistomes_lifecycle.gif). Acedido a 20 de Maio de 2014.
- Centro de Controlo e Prevenção de Doença (C.D.C.) – Schistosomiasis [Online]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/>. Acedido a 12 de Maio de 2014.
- Chiodini, P. L., Moody, A. H., Manser, D. W. 2001. *Atlas of medical helminthology and protozoology*, 4ª edição, Churchill Livingstone. Londres, Páginas 27-29.
- Chitsulo L., Engels D., Montresor A., Savioli L. The Global Status of Schistosomiasis and Its Control. 2000. *Acta Tropica*, **77**: 41-51.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., Savioli, L. 2002. The global epidemiology situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Tropica*, **77** (1):41.
- Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., Archer, S. 1995. “Antischistosomal drugs: past, present and future?” *Pharmacology and Therapeutics*, **68** (1): 35 -85
- Coelho, M.V. 1954. Acção das formas larvárias de *Schistosoma mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. *Publicações Avulsas Instituto Aggeu Magalhães*, **3** (3): 39 -45.



- Coelho, P. M. Z. 1995. Resistência e suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria* , In: Barbosa, F. S. *Tópicos em Malacologia Médica*, Edições Fiocruz. Rio de Janeiro, Páginas 208-217.
- Collins, A. R. 2004. "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations". *Molecular Biotechnology Journal* , **26** (3): 249– 61.
- Davis, A. 2003. *Helmintic Infections*. In C. Cook, & A. Zumla, *Manson's Tropical Diseases*, Rinchoa: Publicações Técnico - Científicas, LDA, **80**: 1431-1463.
- Dejong, R.J., Morgan, J.A.T., Paraense, W.L., Pointier, J.P., Amaristia, M., Auek-Kumi, P.F.K., Babiker, A., Barbosa, C.S., Brémond, P., Canense, A.P., Pereira de Souza, C., Dominguez, C., File, S., Gutierrez, A., Incani, R.N., Kawano, T., Kazibwe, F., Kpikpi, J., Lwambo, N.j.S., Mimpfoudi, R., Njiokou, F., Poda, J.N., Sene, M., Mkoji, G. & Loker, E.S. 2001. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. *Molecular Biology and Evolution*, **18** (12): 2225-2239.
- Eissa, M. M., El-Azzouni, M. Z., Amer, E.I., Baddour, N.M. 2011. Miltefosine, a promising novel agent for *Schistosomiasis mansoni*. *International Journal of Parasitology*, **41**: 235- 242.
- Fernandez, L. S., Jobling, M. F., Andrews, K. T., & Avery, V. M. 2008. Antimalarial activity of natural product extracts from Papua New Guinean and Australian plants against *Plasmodium falciparum*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Phytotherapy Research*, **22** (10), 1409-1412.
- Fenwick, A., Webster, J.P. 2006. "Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance". *Current Opinion on Infectious Diseases*, **19** (6): 577 – 582.

- Grácio, M. A. A. & Guerreiro, M. G. R. 1993. Estudo da suscetibilidade de *Biomphalaria pfefferi* da Guiné Bissau a *Schistosoma mansoni* do Brasil. I- Produção de cercarias. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **1** (1): 65-68.
- Grácio, M.A.A. 2001. Sumário das aulas de Helminologia Médica II (Cursos de Mestrados em Parasitologia Médica).
- Grazeffe, V.S.,Tallarico,L. F., Pinheiro, A., Kawano, T., Suzuki, M. F., Okazaki, K., Pereira, C. A. B., Nakano, E. 2008. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research*, **654**: 58-63.
- Gryseels, B., Mbaye, A., De Vlas, S.J., Stelma, F.F., Guisse, F., Van Lieshout, F.D., Diop, M., Ly, A., Tchuem-Tchuente, L. A., Engels, D., Polman, K. 2001. “Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance?”*Tropical Medicine and International Health*, **6**: 864 – 873.
- Gryseels, G.N., Polman, K., Clerinx, J. & Kestens, L. 2006. Human Schistosomiasis, *Lancet*, **368**: 1106-1118.
- Gustavino, B. Scornajenghi, K.A., Minissi, S. & Ciccotti, E. 2001. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-ray and colchicine. *Mutation Research*, **494**: 151 -159.
- Indjai, B., Catarino, L. & Mourão, D. 2010. Mezinhos de Orango – Plantas medicinais e pessoas da ilha da Rainha Pampa. IBAP, Bissau.
- Ivanchenko M.G., Lerner J.P., McCormick R.S., Toumadje A., Allen B., Fischer K., Hedstrom O., Helmrich A., Barnes D.W., Bayne C.J.1999. Continuous in vitro propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the

- human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96** (2): 4965-4970.
- Jorgensen, A., Kristensen, K. & Stothard, R. 2004. Investigation of the “Ancyloplanorbidae” (Gastropoda, Pulmonata, Hygrophila): preliminary evidence from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32**: 778 – 787.
  - Jurberg, P. 1989. Plantas empregadas como moluscicidas: uma visão crítica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **84**: 76-83.
  - Katz,N.1977.Chemotherapy of *schistosomiasis mansoni*. *Advances in Parasitology*, **14**: 1-70.
  - Katz,N.1999.Dificuldade no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **32** (6): 705 -711.
  - Koné,W.M.,Vargas,M.,& Keiser, J. 2011. Anthelmintic activity of medicinal plants used in Côte d’Ivoire for treating parasitic diseases. *Parasitology Research*, **110** (6), 2351-2362.
  - Lambert,R.A.1973.Parasitologia: Identificação de Helminthas. Série de Auxiliares de Laboratório. Ed. F.J. Baker. Páginas 32-50.
  - MacDonald,J.A.1995.*Medicinal Plants Exploration – Past and Present*. *Arnoldia*, Páginas 3-12.
  - Maiga, A., Diallo, D., Fane, S., Sanogo, R., Paulsen, B. S., & Cisse, B. 2005. A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, **96** (1-2), 183-193.

- Malek, E. A., Cheng T. C. 1974. *Medical and Economic Malacology*, Academic Press, New York.
- Malek, E.A.1980. *Snail-transmitted parasitic diseases*. Volume I, CRC Press, Página 334.
- Medina, J. M., Peixoto, J. L. B., Silva, A. A., Haraguchi, S. K., Falavigna, D. L. M., Zamuner, M. L. M., Sarragiotto, M. H. e Vidotti, G. J.2009. Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19** (1): 207-211.
- Mohamed, A. H. 2011. Sublethal toxicity of Roundup to immunological and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* to *Schistosoma mansoni* infection. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74**: 754-760.
- Molgaard, P., Nielsen, S.B., Rasmussen, D.E., Drummond, B.R., Makaza, N & Andreassen, J.2001. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. *Journal of Ethnopharmacology*, **74** (3): 257-264.
- Morgan, J. A., Dejong, R. J., Snyder, S. D., Mkoji G. M. & Loker E. S. 2001. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology*, **123** (7): 211-228.
- Neves,D.P. 2011. *Parasitologia Humana*,12<sup>a</sup> Edição, Editora Atheneu. São Paulo, Páginas 231-240.
- Neves, J.K., Botelho, S.P., Melo, C.M., Pereira, V.R., Lima, M.C., Pitta, I.R., Albuquerque, M.C., Galdino, S.L. 2010. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, **107**:531-538.

- Nikiema, A. & Pasternak, D. 2008. *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. In: Louppe, D., Oteng-Amoako, A.A. & Brink, M. (Eds.) *Plant resources of tropical Africa*, Wageningen :PROTA Foundation, Páginas 339-344.
- Organização Mundial De Saúde (O.M.S) – Schistosomiasis [Online]. Disponível em : <http://www.who.int/topics/schistosomiasis/en/>. Acedido a 8 de Maio de 2014.
- Pal, R. S.; Ariharasivakumar, G.; Girhepunjhe, K.; Upadhyay, A. 2009. Invitro antioxidative activity of phenolic and flavonoids compounds extracted from seeds of *Abrus precatorius*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **1**: 136-43.
- Paraense, W.L. 2008. Histórico do género *Biomphalaria* -Morfologia e Sistemática morfológica. In: Carvalho O.S., Coelho P.M.Z, Lenzi H.L., *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*, 1ª Edição, Editora Fiocruz., **8**: 288 – 307.
- Perret, S., Whitfield, P.J. 1996. *Currently available molluscicides*. *Parasitology Today*, **12**: 156 – 159.
- Petrovska, B. B. 2012. Historical review of medicinal plants usage. *Pharmacognosy Reviews*, **6** (11): 1-5.
- Pointier, J. P. 1982. Étude de la croissance de *Biomphalaria glabrata* mollusque hôte intermediaaire de la Schistosomose intestinal dans les fôrets merecageuses a Pterocarpus de Gadalupe (Antilles Françaises). *Malacologia*, **22** (1-2): 395 -398.
- Pointier, J. P. 1993. The introduction of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) to the island of Saint Lucia (West Indies) and its role in the decline of *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, **54** (1): 13-18.

- Pointier, J. P., David, P., Jarne, P. 2005. Biological invasions: the case of planorbid snails. *Journal of Helminthology*, **79**(3): 249-256.
- Reimert, C. M., Tukahebwa, E. M., Kabatereine, N. B., Dunnec, D. W., & Vennervald, B. J. 2008. Assessment of *Schistosoma Mansoni* induced intestinal inflammation by means of eosinophil cationic protein, eosinophil protein X and myeloperoxidase before and after treatment with praziquantel. *Acta Tropica*, **105** : 253 -259.
- Rey, L. 2008. Bases da parasitologia Médica. Rio de Janeiro, *Editora Guanabara Koogan*, **16**: 165-194.
- Ross, A.G., Bartley, P.B., Sleight, A.C., Olds, G.R., Li, Y., Williams, G.M., McManus, D. 2002. *Schistosomiasis*. *The New England Journal of Medicine*, **346**: 1212-1220.
- Rug, M., Ruppel, A. 2000. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes. *Tropical Medicine and International Health*, **55**: 423-429.
- Ruppert , E. E., Fox , R. S., Barnes . 2005. R. D., *Zoologia dos Invertebrados*. 7ª edição. São Paulo : Roca , 323 – 481.
- Schwetz, J. 1951. Notes conchyliologiques et ecologiques sur les mollusques centro-africains vecteurs de Bilharziose. Première étude: Les Planorbes. *Annales de la Société royale zoologique de Belgique* , **82**(2) : 353-377.
- Sharaf El-Din , A.T , Bakry, F.A, Tantawy, A. 2001 . Molluscicidal activity of *Zygophyllum simplex* (Family; Zygophyllaceae) against *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*, *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, **4**: 131–143.

- Silva, J. da; Simeoni, N.; Groff, A. A.; Ianistcki, M.; Benvegnú, V.; Schoder . 2007. O Ensaio Cometa na Avaliação da Genotoxicidade Induzida por Poluentes Atmosféricos Utilizando como Biomonitor o Molusco *Cantareus aspersus* (Muller, 1774). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, **2**: 45-51.
- Simões, M. & Medeiros, L.1980. Verificação de suscetibilidade de *Planorbarius metidjensis* e *Bulinus contortus* de Portugal ao *Schistosoma haematobium* de Angola. Garcia de Orta, *Série Zoologia*, **9** (1-2): 67- 70.
- Singh, S. and Singh, D. K.1999, Effect of molluscicidal components of *Abrus precatorius*, *Argemone mexicana* and *Nerium indicum* on certain biochemical parameters of *Lymnaeu acuminata*. *Phytotherapy Research*, **13**: 210– 213.
- Singh, S. K., Yadav, R. P., Singh, A.2009. Molluscicides from some common medicinal plants of eastern Uttar Pradesh, India. *Journal of Applied Toxicology*, **30**: 1-7.
- Souza, C.P.1995. Molluscicide controlo of snail vectors of schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **90**: 165-8.
- Souza, C.P., Lima, L.C.1990. *Moluscos de Interesse Parasitológico do Brasil*, Série Esquistossomose 1, 2ª ed., Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, Página 79.
- Tice, R. R. 2000. "Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* Genetic Toxicology Testing". *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35** (3): 206– 221.
- Thompson, S. N. 1997. *Physiology and Biochemistry of Snail-larval Trematode relationships* in *Advances in Trematode Biology*. Eds Bernard Fried & Thaddeus K. Graczyk, *CRC Press*: 149 – 195.

- Vidigal, T.HDA, Spatz, L., Nunes, D.N., Simpson, A.J.G., Carvalho, O.S. & Dias Neto, E. 1998. *Biomphalaria* spp: identification of intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by Polymerase Chain reaction Amplification and Restriction Enzyme Digestion of the Ribosomal RNA Gene Intergenic Spacer. *Experimental Parasitology*, **89** (1): 180-187.
- Webbe, G. el Hak, S. 1990. Progress in the control of schistosomiasis in Egypt 1985-1988. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **84** (3): 394-400.
- W.H.O. 1993. The control of Schistosomiasis: Second Report of the Who Expert Committee, World Health Organization, Geneva. *Who Technical Report Series*, **830**: 1-86



## **Capítulo VIII - Anexos**

## 8. Anexos

### Anexo A

#### **Preparação dos tampões para a técnica de *Comet assay* (adaptado de Azqueta *et al*, 2013) :**

- **Tampão de lise**

2,5 M de NaCl, 0,1 mM de EDTA, 10 mM de Tris, 1% de Triton X-100 e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO), pH=10.

- **Tampão PBS**

1,5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  , 8 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 mM de KCl e 0,14 M NaCl, pH = 7,4 .

- **Tampão alcalino**

0,3 M de NaOH e 1 mM de EDTA, pH > 13.